

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Zoologia
Pós-Graduação em Biologia Animal

**Biologia Reprodutiva e Efeitos do Tributilestanho (TBT)
sobre *Mytella charruana* e *Mytilopsis leucophaeta* (Bivalvia –
Mollusca) do Estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco**

Daniele Claudino Maciel

RECIFE
2011

DANIELE CLAUDINO MACIEL

**Biologia reprodutiva e Efeitos do Tributilestanho (TBT)
sobre *Mytella charruana* e *Mytilopsis leucophaeta* (Bivalvia –
Mollusca) do Estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco**

*Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal da Universidade
Federal de Pernambuco como
requisito para a obtenção do título de
mestre.*

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Botelho de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Recife
2011

Maciel, Daniele Claudino

Biologia reprodutiva e efeitos do Tributilestanho (TBT) sobre *Mytella charruana* e *Mytilopsis leucophaeta* (Bivalvia- Mollusca) do estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco/ Daniele Claudino Maciel – Recife: O Autor, 2011.

81 folhas : il., fig., tab.

Orientador: José Roberto Botelho de Souza

Co-Orientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Biologia Animal, 2011.

Inclui bibliografia

1. Molusco 2. Estuários 3. Pernambuco I. Título.

594.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-125

DANIELE CLAUDINO MACIEL

Biologia reprodutiva e Efeitos do Tributilestanho (TBT) sobre *Mytella charruana* e *Mytilopsis leucophaeta* (Bivalvia – Mollusca) do Estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco

Orientador:


Prof. Dr. José Roberto Botelho de Souza

Co-Orientador:


Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Examinadores Titulares:


Prof. Dr. Ralf Schwamborn
Departamento de Zoologia da UFPE


Prof.ª, Dra. Mônica Lúcia Botter Carvalho
Departamento de Biologia da UFRPE


Prof.ª, Dra. Paula Braga Gomes
Departamento de Biologia da UFRPE

Examinadores Suplentes:


Prof.ª, Dra. Eliete Zanardi Lamardo
Departamento de Oceanografia da UFPE


Prof.ª, Lília Pereira de Souza Santos
Departamento de Oceanografia da UFPE

Recife
2011

AGRADECIMENTOS

A minha querida família, minha mãe, minhas irmãs, meu pai e meus cunhados, que sempre torceram por mim, e que dividem comigo mais uma vez este momento de alegria e realização.

Ao meu incrível esposo, que foi sempre tão presente em todos os momentos do mestrado, desde minha aprovação até aqui, não tenho palavras para descrever a sua importância em minha vida.

A família que ganhei com o casamento, sogro, sogra, cunhada, que também sempre estiveram torcendo pra que tudo desse certo.

As minhas queridas amigas, Andresa, Raiana e Amanda que são um presente de Deus em minha vida.

Aos meus orientadores, Beto e Paulo, não só por ter me dado a oportunidade de aprender e me desenvolver profissionalmente, mas também pela atenção e pela amizade, que ainda pretendo cultivar por muito tempo.

As queridas “lacmarinas”, Cris, Kamilla, Gabi, Dani, Érika, Thay e Natália, adoro essas meninas.

A Mari, que me ajudou muito para que eu pudesse concretizar a dissertação e que me proporcionou dias de muita alegria e muitas risadas.

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia, que sempre me ajudaram e tiveram paciência com as minhas trapalhadas, foram fundamentais para que eu pudesse desenvolver meus experimentos e também pelo carinho e amizade que tiveram comigo.

Aos queridos do LABPOR, e ao professor Ulysses por terem cedido a capela e serem sempre tão atenciosos.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Celular e Ultra-estrutura e a professora Cristina Peixoto, por terem possibilitado a realização das análises histológicas, e pelo tempo e paciência que tiveram para me ensinar as técnicas histológicas.

Ao professor Alfredo e toda equipe do LAPAVI, em especial a Suzane e Rebeca, que cederam as microalgas utilizadas durante os experimentos.

A minha turma do mestrado pelo companheirismo e amizade, adorei conhecer pessoas tão diferentes e tão especiais.

A Capes por ter financiado meus estudos.

Ao Cabanga Iate Clube de Pernambuco e ao Centro de Mergulho Aquáticos por terem permitido a coleta dos animais.

E por fim, agradeço a Deus por ter me concedido uma vida maravilhosa, rodeada de pessoas especiais que contribuíram de forma ímpar para a concretização desta etapa.

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	XI
Resumo	XII
Abstract	XIII
Capítulo I	1
Introdução Geral	2
A poluição dos ecossistemas aquáticos e o monitoramento ambiental.....	2
Ecotoxicologia Aquática.....	4
Tributilestanho e seus efeitos sobre organismos marinhos.....	7
Legislação.....	11
Biologia Reprodutiva e Distúrbios endócrinos em Invertebrados.....	13
<i>Mytella charruana</i> e <i>Mytilopsis leucophaeta</i>	15
Hidrográfica do Rio Capibaribe e Bacia do Pina.....	17
Capítulo II	19
1. Resumo	20
2. Introdução.....	20
3. Material e Métodos	22
4. Resultados.....	25
4.1 Parâmetros Abióticos.....	25
4.2 Variação no Tamanho e Razão Sexual.....	26
4.2.1 <i>Mytilopsis leucophaeta</i>	26
4.2.2 <i>Mytella charruana</i>	28
4.3 Estágios de Desenvolvimento Gonadal e Ciclo Reprodutivo.....	31
4.3.1 <i>Mytilopsis leucophaeta</i>	31
4.3.2 <i>Mytella charruana</i>	35
4.4 Índice Gonadal Médio.....	37
4.5 Intersex em <i>Mytilopsis leucophaeta</i>	39
5. Discussão.....	40
6. Conclusões	44

Capítulo III	45
1. Resumo	46
2. Introdução	46
3. Material e Métodos	48
3.1 Coleta e manutenção dos animais, e preparo das soluções de TBT.....	48
3.2 Ensaio com exposição de 96 horas.....	49
3.3 Ensaio com exposição de 14 dias.....	49
3.4 Taxa de Filtração.....	49
3.5 Frequência de fechamento de valvas.....	50
3.6 Histologia gonadal.....	50
3.7 Análises estatísticas.....	51
4. Resultados.....	51
4.1 Ensaio com exposição de 96 horas.....	51
4.1.1 Mortalidade.....	51
4.1.2 Taxa de Filtração.....	52
4.1.3 Frequência de fechamento de valvas.....	55
4.2 Ensaio com exposição de 14 dias.....	57
4.2.3 Mortalidade.....	57
4.2.4 Frequência de fechamento de valvas.....	58
4.2.3 Taxa de Filtração.....	59
4.2.4 Histologia das Gônadas.....	60
5. Discussão.....	62
5.1 Mortalidade.....	62
5.2 Taxa de Filtração.....	64
5.3 Frequência de fechamento das valvas.....	65
5.4 Histologia Gonadal.....	66
Conclusões	68
Referências Bibliográficas	69

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1.1. Efeitos dos poluentes no ecossistema.....	05
Figura 1.2. Representação da estrutura molecular de um Hidreto de Tributilestanho a esquerda e de um Cloreto de Tributilestanho a direita.....	08
Figura 1.3. <i>Mytella charruana</i> coletada no estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco. A direita detalhe da coleta de <i>Mytella charruana</i> no estuário.....	16
Figura 1.4. (a) . <i>Mytilopsis leucophaeta</i> coletado no estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco. (b) . No detalhe (seta) apófise característica dos animais desta espécie.....	16
Figura 1.5. Fotografia aérea da Bacia do Pina-PE, Brasil. Fonte: Google Earth.....	18

Capítulo II

Figura 2.1. Locais de coleta na Bacia do Pina, Pernambuco, durante Agosto de 2009 a Setembro de 2010. P1 (8°4'46.44''S e 34°53'26.48''O) e P2 (P2) (8°4'23.99''S e 34°52'48.02''O). Fonte: Google Earth. 20.12.2010.....	23
Figura 2.2. Variação dos parâmetros abióticos, Temperatura (°C) e Salinidade entre os meses de setembro de 2009 a agosto de 2010 no ponto um (P1) da Bacia do Pina, Pernambuco.....	25
Figura 2.3. Variação dos parâmetros abióticos, Temperatura (°C) e Salinidade entre os meses de Outubro de 2009 a Setembro de 2010 no ponto dois (P2) da Bacia do Pina, Pernambuco...	26
Figura 2.4 Média e desvio padrão do comprimento e largura da concha de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> coletados na Bacia do Pina, Pernambuco, no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010.....	27
Figura 2.5 Número de machos, fêmeas e indiferenciados de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> coletados na Bacia do Pina, Pernambuco durante os meses de setembro de 2009 a agosto de 2010.....	28
Figura 2.6. Média e desvio padrão do comprimento e largura da concha de <i>Mytella charruana</i> coletados na Bacia do Pina, Pernambuco, no período de outubro de 2009 a setembro de 2010.....	29
Figura 2.7. Número de machos, fêmeas e indiferenciados de <i>Mytella charruana</i> coletados na Bacia do Pina, Pernambuco durante os meses de Setembro de 2009 a Agosto de 2010.....	29
Figura 2.8. (a e b) Indivíduo de <i>Mytella charruana</i> de sexo indiferenciado devido à presença	

de parasitas no tecido gonadal. Em (c) observa-se uma fêmea com castração quase que total devido à presença de parasitas. (a) aumento de 10x e (b e c) de 40x.....	31
Figura 2.9. Estágios de desenvolvimento gonadal em fêmeas de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> coletados na bacia do Pina, Pernambuco durante setembro de 2009 a agosto de 2010. (a.) Gametogênese inicial. (b.) Gametogênese avançada. (c.) Maturação. (d.) Desova parcial. (e.) Desova total. Figuras a esquerda aumento 10x e a direita aumento de 40x.....	32
Figura 2.10. Estágios de desenvolvimento gonadal em machos de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> coletados na bacia do Pina, Pernambuco durante setembro de 2009 a agosto de 2010. (a.) Gametogênese inicial. (b.) Gametogênese avançada. (c.) Maturação. (d.) Desova parcial. (e.) Desova total. Figuras a esquerda aumento 10x e a direita aumento de 40x.....	34
Figura 2.11. Estágios gonadais de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> na Bacia do Pina, Pernambuco, entre Setembro de 2009 a Agosto de 2010 (n mensal= 20 indivíduos). DT=Desova total, DP= Desova Parcial, MD= Maduro, GA= Gametogênese avançada, GI= Gametogênese inicial e ID= indiferenciado.....	34
Figura 2.12. Estágios de desenvolvimento gonadal em fêmeas de <i>Mytella charruana</i> coletados na bacia do Pina, Pernambuco durante outubro de 2009 a setembro de 2010. (a.) Gametogênese inicial. (b.) Gametogênese avançada. (c.) Maturação. (d.) Desova parcial. (e.) Desova total. Figuras a esquerda aumento 10x e a direita aumento de 40x.....	36
Figura 2.13. Estágios de desenvolvimento gonadal em machos de <i>Mytella charruana</i> coletados na bacia do Pina, Pernambuco durante outubro de 2009 a setembro de 2010. (a.) Maturação. (b.) Desova parcial. Figuras a esquerda aumento 10x e a direita aumento de 40x..	37
Figura 2.14. Estágios gonadais de <i>Mytella charruana</i> na Bacia do Pina, Pernambuco, entre Outubro de 2009 a Setembro de 2010 (n mensal= 20 indivíduos). DT=Desova total, DP= Desova Parcial, MD= Maduro, GA= Gametogênese avançada, GI= Gametogênese inicial e ID= indiferenciado.....	37
Figura 2.15. Variação do Índice Gonadal Médio (IGM) de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> coletados na Bacia do Pina, Pernambuco entre os meses de setembro de 2009 e agosto de 2010.....	38
Figura 2.16. Variação do Índice Gonadal Médio (IGM) de <i>Mytella charruana</i> coletados na Bacia do Pina, Pernambuco entre os meses de outubro de 2009 e setembro de 2010.....	39
Figura 2.17. Ocorrência de Intersex em macho de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> coletado na Bacia do Pina, Pernambuco. No detalhe (seta) a presença de ovócito em meio aos gametas masculinos. Aumento 40x.....	40

Capítulo III

Figura 3.1. Monitoramento da taxa de filtração em <i>Mytilopsis leucophaeta</i> após 14 dias de exposição ao TBTCI. Detalhe de um aquário na parte inferior direita.....	50
--	----

Figura 3.2. Taxa de mortalidade de <i>Mytella charruana</i> e <i>Mytilopsis leucophaeta</i> após 96h de exposição ao TBTCI. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = controle de solvente). Elipses indicam CL50 calculada pelo método de Spearman-Kärber.....	52
Figura 3.3. Taxa média de filtração de células de microalgas por <i>Mytilopsis leucophaeta</i> submetido a diferentes concentrações de TBTCI, (a) após uma hora e (b) após 24 horas da introdução das microalgas. Barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente).....	54
Figura 3.4. Taxa média de filtração de células de microalgas por <i>Mytella charruana</i> em diferentes concentrações de TBTCI após uma hora (a) e após 24 horas (b) da introdução das microalgas.. Barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente).....	55
Figura 3.5. Percentual médio de indivíduos de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> com valvas fechadas entre 48h e 76h após o início da exposição. A barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente).....	56
Figura 3.6. Percentual médio de indivíduos de <i>Mytella charruana</i> com valvas fechadas entre 48h e 76h após o início da exposição. A barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente).....	57
Figura 3.7. Taxa de mortalidade de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> após 14 dias de exposição ao TBTCI. n=30 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente). Elipse indica CL50 calculada pelo método de Spearman-Kärber.....	58
Figura 3.8. Percentual médio de indivíduos de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> com valvas fechadas durante o experimento. A barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=30 indivíduos por tratamento. (*: diferente do controle , 0-S = Controle de solvente).....	59
Figura 3.9. Taxa de Filtração de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> durante uma hora. Barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=30 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle/solvente).....	60
Figura 3.10. . Estágios de desenvolvimentos gonadal de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> no final do experimento. Rep=repouso; Gam=gametogênese; Mat=maturação e Des=desova. (0-S = Controle de solvente).....	61
Figura 3.11. Indivíduo de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> em estágio de indiferenciação sexual (repouso). Aumento de 10x à esquerda e 40x à direita.....	61
Figura 3.12 Macho de <i>Mytilopsis leucophaeta</i> após exposição a 10 µg L ⁻¹ de TBTCI em desova parcial No detalhe (seta) observa-se estrutura com grande quantidade de gametas masculinos. Aumento de 10x.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Razão sexual Macho/ Fêmea (M/F) de <i>Mytilopsis leucophatea</i> durante os meses de setembro de 2009 a agosto de 2010.	28
Tabela 2. Razão sexual Macho/ Fêmea (M/F) de <i>Mytella churruana</i> durante os meses de amostragem.....	30

RESUMO

Biologia Reprodutiva e Efeitos do Tributilestanho (TBT) sobre *Mytella charruana* e *Mytilopsis leucophaeta* (Bivalvia – Mollusca) do Estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco

O tributilestanho é um biocida extremamente tóxico, utilizado para proteger os cascos de embarcações de incrustações de invertebrados. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos deste composto sobre *M. charruana* e *M. leucophaeta*, e descrever o ciclo reprodutivo destas espécies, que foi avaliado de Setembro de 2009 a Setembro de 2010. Para a realização dos ensaios e determinação do ciclo reprodutivo, os animais foram coletados em dois pontos do estuário do Rio Capibaribe. Para *M. leucophaeta* foram identificados dois períodos de intensa atividade gametogênica, entre dezembro de 2009 e janeiro de 2010, e em março de 2010; e dois períodos de desova, de setembro a novembro de 2009, e em agosto de 2010. Para *M. charruana* a desova ocorreu em praticamente todos os meses, com destaque para abril e agosto de 2010. O ciclo reprodutivo de ambas as espécies demonstrou ser contínuo e assincrônico. Para avaliar a toxicidade aguda do TBT sobre *M. charruana* e *M. leucophaeta*, indivíduos das duas espécies foram expostos por 96h a concentrações de 2, 5, 12,5 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de tributilestanho TBTCI. Observou-se mortalidade de 100% dos indivíduos de *M. charruana* expostos a concentração de 12,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ enquanto que para *M. leucophaeta* houve mortalidade de 100% dos indivíduos expostos a 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A proporção de indivíduos de ambas as espécies com valvas fechadas aumentou significativamente com o aumento da concentração de cloreto de tributilestanho (TBTCI) ($p < 0,05$). Os resultados indicam que *M. charruana* é mais sensível à exposição ao TBT que a espécie exótica *M. leucophaeta*, o que pode ser relevante para o sucesso da colonização do invasor. Para avaliar a toxicidade crônica do TBT sobre *M. leucophaeta*, indivíduos foram expostos por 14 dias a concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A mortalidade foi menor do que 20% até 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, atingindo 73,3% no tratamento com 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A taxa de filtração nos controles foi maior que nos tratamentos com TBTCI ($F_{(4, 15)}=57,3$; $p < 0,0001$). A proporção de indivíduos com valvas fechadas foi maior no tratamento com 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,0001$). Os resultados sugerem que em um maior período de exposição a concentrações mais baixas, os indivíduos encerram suas valvas diminuindo consequentemente a taxa de filtração. Ambas as espécies apresentaram respostas ecologicamente relevantes à exposição ao TBT, podendo ser utilizadas no monitoramento da poluição por este composto no ambiente.

Palavras-chave: Gametogênese, desova, mortalidade, taxa de filtração e fechamento das valvas.

ABSTRACT

Reproductive Biology Tributyltin effects on *Mytella charruana* and *Mytilopsis leucophaeta* (Bivalvia – Mollusca) from Capibaribe River Estuary, Pernambuco

Tributyltin is a potent biocide used to protect ships from invertebrate incrustation. The objectives of this work were to evaluate the effects of this chemical on the bivalves *M. charruana* and *M. leucophaeta*, and describe the reproductive cycle of these species, which was evaluated from September 2009 to September 2010. Animals were collected at 2 sites in the Capibaribe river estuary. Two peaks of intense gametogenic activity were found for *M. leucophaeta*, between December 2009 and January, and in March 2010; and two spawning peaks, from September to November 2009, and in August 2010. Spawning occurred during all months for *M. charruana*, especially in April and August 2010. The reproductive cycle for both species was continuous and asynchronous. Individuals from both species were separately exposed to 2, 5, 12,5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of tributyl chloride (TBTCI) over 96h to evaluate acute toxicity. We observed 100% mortality of individuals of *M. charruana* exposed to concentrations of 12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ while for *M. leucophaeta* 100% mortality of individuals exposed to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. The proportion of individuals with closed valves increased significantly with the increase in TBTCI concentration ($p < 0,05$). Results indicated that *M. charruana* is more sensitive to TBTCI than the exotic species *M. leucophaeta*, which might be relevant to the success of the colonization of the invader. Chronic toxicity of TBTCI was evaluated on *M. leucophaeta* through exposure of individuals for 14 days to 1, 5 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ TBTCI. Mortality was smaller than 20% at concentrations up to 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, reaching 73,3% at 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Algae filtration rates were higher in controls compared with TBTCI treatments ($F_{(4, 15)}=57,3$; $p < 0,0001$). The proportion of individuals with closed valves was higher at 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,0001$). Results suggest that during a larger exposure period at lower concentrations, individuals close valves and consequently reduce filtration rates. Both species presented ecologically relevant effects to TBTCI exposure, and can be used to monitor pollution by this chemical in the environment.

keywords: Gametogenesis, spawning, mortality, filtration rate and valves closure.

Capítulo I

Introdução Geral

Introdução Geral

A poluição dos ecossistemas aquáticos e o monitoramento ambiental

A preocupação com a questão ambiental cresce a cada dia, uma vez que a disponibilidade de muitos recursos naturais já se encontra comprometida devido à contaminação do meio ambiente. Este fato é nitidamente observado nos ambientes aquáticos, nos quais encontramos muitos rios e estuários apresentando queda acentuada na produção pesqueira em função da degradação do meio (Moraes et al. 2001). Em todo o planeta, praticamente não existe um ecossistema que não tenha sofrido influência direta e/ou indireta do homem, como por exemplo, contaminação dos ambientes aquáticos, desmatamentos, contaminação de lençol freático e introdução de espécies exóticas, resultando na diminuição da diversidade de habitats e perda da biodiversidade. Ao longo deste processo o crescimento progressivo dos centros urbanos tem causado degradação ambiental, diminuição da oferta de recursos naturais, e consequentemente a geração de uma crise energética e econômica (Goulart e Callisto, 2003).

O interesse e a preocupação com a contaminação dos oceanos tem aumentado já que, nas últimas décadas, a influência do homem sobre os ecossistemas marinhos tornou-se muito mais intensa (Godoi, 2003). Os ecossistemas marinhos acabam de uma forma ou de outra, constituindo-se em receptáculos temporários ou finais de uma grande variedade e quantidade de contaminantes. Esses ecossistemas vêm recebendo uma carga constante de substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas, através do lançamento direto de efluentes industriais e domésticos ou indiretamente através dos rios, lixiviação de solos e precipitação atmosférica (Moraes et al. 2001).

O monitoramento de variáveis físicas e químicas traz algumas vantagens na avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, tais como: identificação imediata de modificações nas propriedades físicas e químicas da água; detecção precisa da variável modificada, e determinação destas concentrações alteradas. Contudo, a amostragem de variáveis físicas e químicas fornece somente uma fotografia momentânea do que pode ser uma situação altamente dinâmica (Whitfield, 2001). O monitoramento físico e químico da água é incapaz de detectar alterações na diversidade de habitats e microhabitats, e insuficiente para a determinação das consequências da alteração da qualidade de água sobre as comunidades biológicas (Goulart e Callisto, 2003).

A avaliação da qualidade biológica da água começou a ser desenvolvida por ter sido observado que as informações obtidas apenas através das análises dos parâmetros físicos e químicos da água não eram suficientes para descrever integralmente o nível de qualidade dos corpos hídricos (Baptista, 2008), uma vez que é praticamente impossível quantificar todos os parâmetros químicos. Além disso, a medida dos parâmetros químicos em si não informa nada sobre o potencial toxicológico de uma amostra de água, aspecto fundamental que irá determinar se ocorrerão efeitos danosos às diferentes espécies. Ainda segundo Galvão (2009), ao se conhecer as propriedades físico-químicas dos contaminantes e dos ecossistemas onde estes são lançados, pode-se prever a formação dos complexos entre os agentes químicos e os compartimentos abióticos (sedimento, água, ar e etc.), o que permite prever a biodisponibilidade destes contaminantes. Por outro lado, dados sobre a ecologia das espécies, como o hábito alimentar e uso do habitat, são fundamentais para se buscar os alvos (espécies) dos contaminantes no ambiente.

A partir da segunda metade dos anos 70, as pesquisas sobre monitoramento biológico ou biomonitoramento aumentaram de modo quase exponencial (Pivetta et al. 2001). No Brasil, é relativamente recente a preocupação com a proteção de ecossistemas marinhos e existem grupos com os estudos voltados para avaliação de impacto biológico de poluentes lançados no mar. A escassez de dados ecotoxicológicos para espécies características da costa brasileira limita a adequada gestão dos recursos marinhos e estuarinos (Moraes et al, 2001).

O uso de parâmetros biológicos para medir a qualidade da água se baseia nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem (Buss et al. 2003). As respostas das comunidades biológicas, ou de organismos da mesma espécie, podem ser monitoradas em uma variedade de formas, de modo que se possam indicar os efeitos de determinados poluentes sobre o ecossistema. Mudanças fisiológicas ou morfológicas podem ser avaliadas como respostas ao estresse ou estímulos adversos, como por exemplo, à presença de contaminantes (Chapman e Jackson, 1996). Desta forma, O monitoramento biológico é realizado principalmente através da aplicação de diferentes protocolos de avaliação, que podem incluir parâmetros medidos em diferentes níveis de organização biológica.

O monitoramento biológico é realizado principalmente através da aplicação de diferentes protocolos de avaliação, índices biológicos e multimétricos, tendo como base a utilização de bioindicadores de qualidade de água e habitat (Goulart e Callisto, 2003).

A utilização de organismos indicadores vem sendo desenvolvida com maior frequência desde a década de 30, em ensaios de campo e laboratório. Essas pesquisas visam a determinação dos efeitos sobre espécies sensíveis causados pela presença de poluentes em corpos d'água e em efluentes domésticos e industriais. As espécies indicadoras podem ter diferentes propósitos, que incluem monitoramento no ponto de lançamento de efluentes, espécies residentes que são usadas como indicadores numa área de interesse potencial, espécies cuja presença indica provável poluição química e espécies utilizadas para ordenar a toxicidade relativa de substâncias químicas (Damato, 2001).

Dentre os grupos de animais utilizados no monitoramento biológico da água destacam-se as comunidades de macroinvertebrados bentônicos. Diversos fatores contribuem para a utilização destes organismos no monitoramento ambiental, como o fato de que os mesmos são abundantes em todos os tipos de sistemas aquáticos, são facilmente coletados com equipamentos baratos, são de rápida identificação, geralmente, permanecem em uma área mais restrita, permitindo uma análise espacial eficiente dos efeitos dos poluentes ou de perturbações físicas do meio (Damato, 2001).

Dentre estes invertebrados, os moluscos bivalves, entre eles os mexilhões, são reconhecidamente os melhores biomonitores em ambientes aquáticos e utilizados em programas nacionais e internacionais de monitoramento ambiental (Bellotto et al. 2005). Na determinação dos efeitos da poluição, os mexilhões são bastante utilizados, pois habitam áreas costeiras, vivendo fixos às rochas e alimentando-se por filtração de partículas em suspensão na água. Devido ao seu modo de vida, estes organismos podem absorver e acumular os compostos químicos que estejam presentes na água, estando assim expostos aos seus efeitos nocivos (Zaroni et al. 2001).

Ecotoxicologia Aquática

A toxicologia aquática pode ser definida como o estudo dos efeitos de compostos químicos de origem natural ou antropogênica sobre organismos aquáticos em vários níveis de organização biológica, partindo de sua interação com o sítio de ação a nível subcelular ou celular, e com o potencial de se propagar para o nível de tecidos, órgãos e atingindo parâmetros representativos do organismo como um todo, como os parâmetros comportamentais. Estes efeitos podem ainda se propagar para além do nível orgânico ou individual, atingindo as populações, comunidades e ecossistemas. (Rand et al. 1995) (Figura 1.1).

A apreciação da ecologia é geralmente extrínseca, e não intrínseca ao estudo toxicológico. Em outras palavras, os ensaios são, em muitos casos, conduzidos com organismos que podem ser facilmente obtidos, cultivados e testados, visando obter dados quanto à toxicidade de substâncias puras ou misturas complexas de químicos sobre organismos representativos da biota. O significado ecológico dos testes com organismos costumava ser uma consideração secundária nesse tipo de estudo (Marques, 2008).

Neste sentido, o termo ecotoxicologia foi proposto pelo professor R. Truhaut em 1969, que a definiu como a ciência que estuda os efeitos tóxicos não intencionais de contaminantes químicos sobre as diferentes espécies dos ecossistemas.

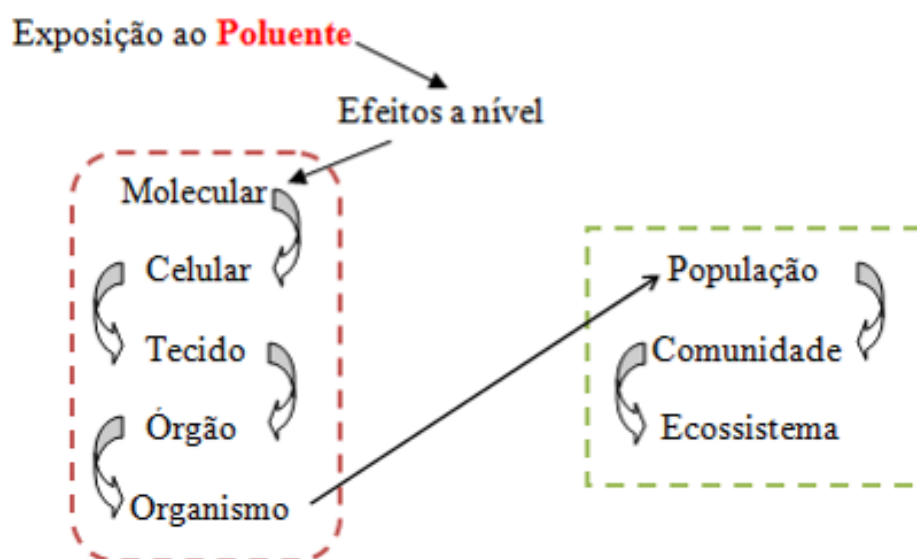


Figura 1.1. Efeitos dos poluentes nos diferentes de organização biológica dos ecossistemas.

A ecotoxicologia é uma ciência multidisciplinar, reunindo várias ciências como a química, a toxicologia, a farmacologia, a epidemiologia e a ecologia, com o principal objetivo de avaliar o risco destes compostos químicos que estão sendo lançados no ambiente pelas diferentes atividades humanas de causarem efeitos deletérios às diferentes espécies animais e vegetais. (Connel, 1999) (Figura 1.2).

Em geral os efeitos toxicológicos dos poluentes estão relacionados à letalidade ou a alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais, que interferem

diretamente no funcionamento do organismo (Forbes e Forbes, 1994). Com o objetivo de avaliar os efeitos dos diferentes contaminantes sobre os organismos, ensaios em laboratório e em campo são utilizados, de modo que se possa conhecer a toxicidade desses agentes e estabelecer limites permissíveis de várias substâncias químicas para a proteção da vida aquática (Aragão e Araújo, 2006).

Além do nível de indivíduos, as respostas das comunidades biológicas, ou de populações, podem ser monitoradas em uma variedade de formas, de modo que se possam avaliar os efeitos de determinados poluentes sobre estes níveis de organização mais elevados dos ecossistemas, e consequentemente de maior relevância ecológica.

Para tal pode-se utilizar desde medidas de abundância até índices biológicos e multimétricos, como é o caso dos índices de integridade biótica aplicados para invertebrados bentônicos e para peixes (Karr, 1986; Barbour et. al., 1999)

Testes com organismos aquáticos têm sido mundialmente utilizados como instrumento analítico para a avaliação da toxicidade de substâncias químicas, efluentes líquidos industriais e domésticos, lixiviados de resíduos sólidos e águas superficiais e marinhas. Esses ensaios são utilizados em programas de monitoramento da qualidade de águas e efluentes ou em procedimentos para a classificação do nível de periculosidade e avaliação de risco de substâncias químicas no ambiente (Zagatto, 2006). Os primeiros relatos de utilização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos datam da década de 1920, sendo que os peixes foram os primeiros animais a serem utilizados (Aragão e Araújo, 2006). Outros animais utilizados comumente em ensaios de toxicidade são os microcrustáceos *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* e *Artemia salina*; equinodermos como *Arbacia lixula* e *A. punctulata*; insetos de água doce como por exemplo os do gênero *Chironomus* spp. e bivalves, como mexilhões do gênero *Mytilus* spp. e ostras do gênero *Crassostrea* spp. (Domingues e Bertoletti, 2006).

Dentre os grupos de animais utilizados no monitoramento biológico da água destacam-se as comunidades de macroinvertebrados bentônicos. Diversos fatores contribuem para a utilização destes organismos no monitoramento ambiental, como o fato de que os mesmos são abundantes em todos os tipos de sistemas aquáticos, são facilmente coletados com equipamentos baratos, são de rápida identificação, geralmente, permanecem em uma área mais restrita, permitindo uma análise espacial eficiente dos efeitos dos poluentes ou de perturbações físicas do meio (Damato, 2001).

Dentre estes invertebrados, os moluscos bivalves, entre eles os mexilhões, são reconhecidamente biomonitoradores eficientes em ambientes aquáticos, e que são utilizados em programas nacionais e internacionais de monitoramento ambiental (Bellotto et al. 2005). Na determinação dos efeitos da poluição, os mexilhões são bastante utilizados, pois habitam áreas costeiras, vivendo fixos às rochas e alimentando-se por filtração de partículas em suspensão na água. Devido ao seu modo de vida, estes organismos podem absorver e acumular os compostos químicos que estejam presentes na água, estando assim expostos aos seus efeitos nocivos (Zaroni et al. 2001).

Tributilestanho e seus efeitos sobre organismos marinhos

Entre as atividades humanas que podem introduzir substâncias químicas no ambiente marinho está o uso de tintas anti-incrustantes, aplicadas nos cascos de navios para evitar que algas, mexilhões e outros organismos se agarrem às embarcações e cujo princípio ativo é constituído por compostos organoestânicos - Tributilestanho (TBT) ou Trifenilestanho (TPhT). Um dos principais efeitos do uso de tais substâncias é o envenenamento do sistema biológico, principalmente de moluscos, originando mutações e condenando espécies à extinção (Godoi et al. 2003).

Os compostos orgânicos de estanho (OTs) estão entre os organometálicos mais utilizados pelo homem. Incluem-se entre as classes de poluentes mais abundantes em ambientes marinhos e estuarinos, resultantes de atividades portuárias bem como de descargas industriais e urbanas (Pletsch et al, 2010). Estes compostos se caracterizam por apresentar um átomo de Sn covalentemente ligado a um ou mais substitutos orgânicos (por exemplo, metil, butil, etil, propil, fenil). Quimicamente são representados pelas fórmulas $R\text{SnX}_3$, $R_2\text{SnX}_2$, $R_3\text{SnX}$ e $R_4\text{Sn}$, nas quais R é corresponde a um grupo alquila ou arila e X indica as espécies aniônicas, como por exemplo, hidretos, óxidos, haletos, acetato, carbonato, cloreto, fluoreto ou hidróxidos (Figura 1.2) (Hoch, 2001; Berto et al. 2006).

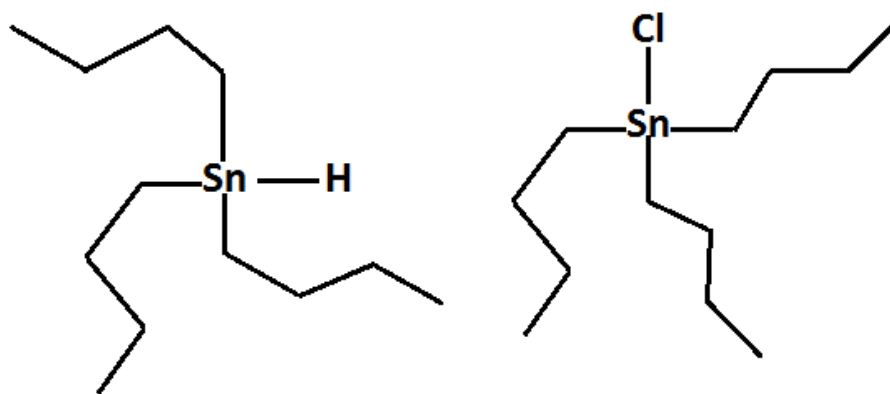


Figura 1.2. Representação da estrutura molecular de um Hidreto de Tributilestanho a esquerda e de um Cloreto de Tributilestanho a direita.

As propriedades físicas e químicas dos organoestânicos dependem do número de ligações Sn-C e dos comprimentos das cadeias de alquila, assim, a solubilidade de OTs na água diminui com o aumento do número e comprimento dos grupos orgânicos, mas também depende dos substitutos aniônicos (Berto et al. 2006). Os efeitos biológicos destas substâncias vão depender da natureza e do número de grupos orgânicos ligados ao Sn. Em geral, os compostos trissubstituídos apresentam máxima atividade toxicológica para os organismos (Hock, 2001).

A utilização dos compostos organoestânicos cresceu nos últimos 30 anos de cerca de 1500 para 50000 toneladas por ano, e esses compostos atualmente são empregados em uma grande variedade de indústrias (Godoi, 2003). O uso como biocida representa 20% da produção total, e inclui o desenvolvimento de inseticidas, fungicidas, bactericidas, preservativos de madeira e agentes anti-incrustantes. Atualmente há amplo uso destes compostos como estabilizadores de cloreto de polivinila (PVC), catalisadores de poliuretano e elastômeros de silicone. Estabilizadores típicos são os Dialquilestanhos, principalmente dimetil-, dibutil- e dioctilestanho. Compostos (mono) organoestânicos são principalmente usados como estabilizadores de PVC e revestimentos de vidro sendo ainda utilizados em tubulações de água potável, resíduos e drenagem de água (Champ, Seligman, 1996; Braunbeck et al. 1998).

A toxicidade dos organoestânicos está associada ao número de componentes orgânicos ligados ao estanho e ao número de átomos de carbono nos componentes orgânicos. A toxicidade em organismos aquáticos geralmente aumenta quando o número de componentes orgânicos aumenta de um para três e diminui com a

incorporação de um quarto, tornando triorganoestânicos mais tóxicos do que as outras formas (EPA, 2003).

O tributilestano (TBT) é um biocida extremamente tóxico, utilizado extensivamente para proteger os cascos de navios. É considerado o mais perigoso de todos os compostos de estanho e vários estudos em diversas partes do mundo têm mostrado os efeitos deste compostos sobre os organismos (Thain, 1986, Ruiz et al. 1994, Guolan e Yong, 1995, McAllister e Kime, 2003, Wu et al. 2010). Entre esses efeitos, os mais significativos estão relacionados à ação de desregulador endócrino que este composto apresenta, afetando a reprodução de organismos marinhos, especialmente gastrópodes. Outros compostos orgânicos de estanho (por exemplo, mono e dibutil) são considerados de menor importância do ponto de vista do impacto causado ao ambiente marinho (OSPAR, 2000).

O TBT tem alta afinidade por partículas e está fortemente ligado aos sedimentos, sendo acumulado muito próximo ao local onde foi lançado. Diversos estudos têm sido realizados para avaliar a bioacumulação e os efeitos destas substâncias em organismos aquáticos, especialmente moluscos e crustáceos, pois estes organismos representam um importante recurso alimentar e são ecologicamente dominantes em muitos habitats. Segundo Bisinoti e Jardim (2004) a persistência dos compostos orgânicos do estanho no ambiente se deve ao caráter lipofílico, podendo acumular-se em bivalves acima de 5µg/g de TBT. Peixes e crustáceos acumulam menos por apresentarem um mecanismo enzimático de degradação do Tributilestano.

A degradação dos organoestânicos ocorre com a progressiva perda dos grupos orgânicos: $R_4Sn \rightarrow R_3SnX \rightarrow R_2SnX_2 \rightarrow RSnX_3 \rightarrow SnX_4$. A remoção dos grupos orgânicos pode ser causada por vários processos, como radiação ultravioleta, clivagem biológica e clivagem química (Hoch, 2001). Nos ecossistemas aquáticos a degradação biológica é a mais significativa, apresentando um tempo de vida médio de alguns dias até vários meses, dependendo da temperatura e biomassa vegetal. O TBT sofre degradação no ambiente de uma forma sequencial, para DBT (di-butil-estanho), MBT (mono-butil-estanho) e posteriormente estanho inorgânico (Santalla, 2008).

Os bivalves filtradores, especialmente os mexilhões têm sido amplamente utilizados como organismos sentinela para monitoramento de ambientes marinhos e estuarinos, devido ao seu potencial de bioacumulação e bioconcentração de poluentes orgânicos e metálicos, incluindo os organoestânicos. Assim, esses organismos fornecem

uma indicação temporal e espacial da distribuição dos contaminantes no ambiente aquático (Kannam e Tanabe, 2009).

A contaminação por TBT em gastrópodes pode ocasionar um fenômeno denominado imposex. Este que é um excelente marcador da contaminação marinha por compostos orgânicos de estanho e se caracteriza pelo surgimento de órgãos sexuais masculinos não funcionais, sobretudo pênis e vaso deferente em fêmeas de moluscos gastrópodes (Castro et al 2000).

Alguns estudos relatam os os efeitos do TBT sobre bivalves marinhos, como alterações no comprimento e largura da concha, no peso e no índice de condição dos animais (Goulán e Yong, 1995); influência na reprodução e desenvolvimento embrionário, reduzindo o recrutamento em algumas populações do bivalve *Scrobicularia plana*, impedindo o desenvolvimento bem sucedido de uma proporção significativa de seus embriões (Ruiz et al. 1995); e efeitos sobre o aparelho digestivo, sendo observado através da análise histológica que a concentração de 10ng/L de TBT em bivalves da espécie *Ostrea edulis* apresentaram diminuição de cerca de 12% na altura das células glandulares digestivas, quando comparados ao controle (Axiak e Sammut, 1995).

Estudos em crustáceos mostram que o TBT afeta o crescimento e a habilidade reprodutiva, como nas fêmeas de misidáceos *Acanthomysis sculpta* (Davidson et al. 1986),. Para o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* a CL50 observada após 96h de exposição foi de 2,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Cloreto de Tributilestanho (TBTCl) (Marques, 2008). Aono e Takeuchi (2008) observaram que fêmeas da espécie *Caprella Danilevskii* (Crustacea, Amphipoda), tiveram a capacidade reprodutiva afetada a concentrações muito baixas de TBT, 1,1 ng.L^{-1} . Huang et al, (2006) observaram que concentrações de 60 ng L^{-1} de Óxido de Tributilestanho (TBTO) podem reduzir a fecundidade do copépode *Pseudodiaptomus marinus*. Ainda segundo os autores, a exposição de copépodes a altas concentrações de TBT por um longo período de tempo pode afetar o desenvolvimento e reprodução, como também diminuir a razão sexual fêmea para macho.

Em vertebrados, McAllister e Kime (2003) constataram que peixes *Dario reiro*, analisados após 70 dias da eclosão, tiveram a razão sexual alterada a concentrações de 0,1 ng L^{-1} de TBT, observando-se a presença de 60% de machos. Em concentrações maiores, 100 ng L^{-1} , observou-se 93% de peixes machos. Os autores observaram ainda,

que em concentrações de $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ houve uma alta produção de espermatozóides sem flagelo, reduzindo significativamente a motilidade espermática.

Apesar do crescimento nas últimas décadas nas pesquisas envolvendo os efeitos dos compostos orgânicos de estanho sobre organismos marinhos, no Brasil são poucas as pesquisas desenvolvidas, e a maioria se concentra em investigar e descrever os efeitos do Tributilestanho e outros organoestânicos sobre moluscos gastrópodes.

Legislação

A preocupação a respeito do impacto ambiental causado pela utilização de tintas anti-incrustantes à base de OTs surgiu no início dos anos 80, quando ficou claro que os organismos que aderem nos cascos dos navios não eram as únicas vítimas, ou seja, outros animais e plantas também estavam sendo afetados (Godoi et al. 2003). Países como Reino Unido, França, Suíça, Estados Unidos, Japão entre outras nações, implantaram ações regulatórias para o uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT (Champ, 2000). Em 1970 ostras da espécie *Cassostrea gigas* foram introduzidas na Inglaterra para cultivo. Poucos anos depois anormalidades no crescimento e espessura da concha destas ostras foram observadas. Inicialmente as anomalias foram associadas à presença de altos níveis de sedimentos em suspensão, entretanto a incidência de anormalidades no crescimento das ostras coincidiu com o aumento no uso de tintas a base de organoestânicos (Waite et al. 1991). Nesta mesma década (70), ostras cultivadas na Baía de Arcachon (França) apresentaram estas anormalidades, como consequência a produção foi afetada por problemas de crescimento e reprodução dos animais (Azieu, 2000). Em meados de 1980, investigadores da França e do Reino Unido começaram a sugerir que o uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT estava prejudicando uma série de outras espécies marinhas, além dos organismos incrustantes (Champ, 2000).

A França foi o primeiro país a regularizar o uso de tintas anti-incrustantes a base de organoestânicos. Foi proibido o uso de tintas contendo mais de 3% de organoestânicos nos cascos de embarcações com menos de 25 m de comprimento, nas áreas de extensas culturas de ostras ao longo do canal Inglês e da costa atlântica. Em 1992, um novo decreto foi elaborado, no qual a proibição foi estendida à venda e utilização de tintas com organoestânicos para barcos com menos de 25m de comprimento, e todos os equipamentos imersos, incluindo redes (Azieu, 2000). A

Organização Marítima Internacional lançou em 2003 um tratado que proíbe o uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT (Choi et al. 2009).

A partir da implementação das ações regulatórias, vários países iniciaram um monitoramento da contaminação das regiões costeiras por compostos orgânicos de estanho. No Reino Unido, observou-se uma diminuição nas concentrações de organoestânicos na água, ostras (*Cassostrea gigas*) e mexilhões (*Mytilus edulis*) após a proibição do uso de tintas a base de TBT em pequenos barcos e equipamentos de maricultura (Waite et al. 1991). Mais tarde, Page (1995) coletou mexilhões *M. edulis* entre Novembro de 1987 e Outubro de 1993, no estuário Tamar, situado no Reino Unido. Segundo o autor, entre 1988 a 1991 houve redução nos níveis de TBT observados nos tecidos dos mexilhões. Em contrapartida, em Maio de 1991 as concentrações voltaram a subir, sugerindo que apesar a proibição de uso de tintas antivegetativas a base TBT, havia ainda entrada destes compostos no ecossistema aquático.

No Japão, em um estudo conduzido entre 1989 entre 1996, observou-se através da análise de bioacumulação de organoestânicos em plâncton e mexilhões, uma redução na concentração de TBT durante o período estudado (Harino et al. 1999). Em 2001, onze anos após a elaboração da legislação regulatória sobre o uso de tintas anti-incrustantes à base de TBT no país, amostras de água e anfípodes da espécie *Caprella* sp. foram coletadas ao longo da costa ocidental japonesa (Murai et al. 2005).. Organoestânicos foram encontrados em 90% das amostras de água, em concentrações em torno de 8.2 ng L⁻¹ de MBT, 3.3 ng L⁻¹ de DBT e 9.0 ng L⁻¹ de TBT. Mesmo onze anos após a implementação da proibição parcial do uso de TBT em tintas antivegetativas, o estudo indicou que o TBT ainda representa um potencial perigo ecológico para a sobrevivência de invertebrados marinhos que habitam a costa oeste do Japão (Murai et al. 2005).

Na Coreia, restrições sobre o uso de tintas antivegetativas a base de TBT foram estabelecidas em Março de 2000, com a proibição total do uso em Novembro de 2003. Amostras de água, sedimentos e bivalves (*Mytilus edulis*, *M. coruscus* e *C. gigas*) foram coletados ao longo da costa coreana entre os anos de 2001 a 2005. Durante o estudo observou-se uma aparente tendência de declínio das concentrações de TBT na costa coreana, isto deve estar relacionado com as restrições e proibição do uso e aplicação do TBT (Choi et al. 2009).

Ainda são poucos os estudos feitos para avaliar os impactos provocados pelos compostos organoestânicos presentes em anti-incrustantes no Brasil (Castro et al. 2000, Fernandez et al. 2002, Lima et al. 2006, Castro et al. 2008). Até o momento apenas uma Instrução Normativa aprovada pela Portaria nº 76 da Diretoria de Portos e Costas publicada em 2007, regula o uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT no país. A publicação Normas da Autoridade Marítima– NORMAM-23/DPC, publicada em 2007, visa estabelecer procedimentos referentes ao controle do uso de Sistemas Anti-incrustantes danosos ao meio ambiente marinho ou à saúde humana, de caráter obrigatório, para as embarcações brasileiras cujas obras vivas necessitam ser pintadas com sistemas anti-incrustantes e para as embarcações estrangeiras que docarem no Brasil para pintura das obras vivas, ou que forem afetadas em regime de AIT (Atestado de Inscrição Temporária). Dentre os pontos abordados na NORMAM-23/DPC ressalta-se a necessidade do desenvolvimento de pesquisas destinadas a verificar a eficiência e a toxicidade dos novos antiincrustantes sem TBT existentes no mercado, em substituição aos produtos com TBT. Entretanto não há nenhuma legislação específica vigente que regularize o uso de tintas a bases de organoestânicos.

Biologia Reprodutiva e Distúrbios endócrinos em Invertebrados

O conhecimento de ciclos de vida de organismos é de grande importância no manejo e conservação dos ambientes. Como a reprodução geralmente apresenta uma menor tolerância ao estresse do que outras funções vitais, a fecundidade pode ser usada como um indicador sensível de perturbações subletais em invertebrados marinhos (Ventura e Pires, 2009). A biologia reprodutiva é fundamental para o entendimento da biologia de qualquer organismo, especialmente para os invertebrados que têm importância econômica, pois informações sobre os aspectos reprodutivos dos animais podem fornecer dados para aplicação de um manejo e cultivo adequados. Entretanto os aspectos relacionados à reprodução dos invertebrados ainda são pouco estudados quando comparado aos dos vertebrados (Adiyodi e Adiyodi, 1988).

O sistema reprodutivo dos bivalves é extremamente simples. As gônadas pareadas são constituídas de túbulos ramificados. O ciclo reprodutivo anual dos bivalves envolve um período de gametogênese seguida por um único ou estendido período de desova e posteriormente um período de reconstituição gonadal (Gosling, 2003).

O sistema endócrino tem papel fundamental na regulação da reprodução dos animais, atuando desde o desenvolvimento dos gametas à diferenciação e maturação sexual. Desta forma, aspectos relacionados à biologia reprodutiva de um animal estão intimamente ligados ao funcionamento do sistema endócrino.

Nos últimos 15 anos uma série de químicos antropogênicos presentes na água tem sido identificada como potenciais desreguladores da reprodução, desenvolvimento e eventos mediados por hormônios, em invertebrados e vertebrados (Aono e Takeuchi 2008). Vários contaminantes, incluindo organoestânicos, afetam a reprodução dos organismos, em alguns casos as alterações reprodutivas e os efeitos no recrutamento de algumas espécies podem levar à eliminação da população, afetando consequentemente as comunidades biológicas.

O sistema endócrino dos invertebrados é semelhante ao dos vertebrados, entretanto ainda são poucos os estudos sobre este tema, desta forma muitos hormônios presentes nos invertebrados não são conhecidos (Oehlmann e Oehlmann, 2003). Geralmente, o sistema endócrino de invertebrados regula processos semelhantes aos dos vertebrados, incluindo o crescimento, diferenciação sexual e reprodução (Oetken et al. 2004).

Há grande interesse científico em um grupo de substâncias químicas presentes no meio ambiente que podem interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução. Essas substâncias são conhecidas como Desreguladores Endócrinos (DE). Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino, tais como, substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, policlorados de bifenilas (PCD), bisfenol A, substâncias farmacêuticas, entre outras) e substâncias naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios) (Bila e Dezotti, 2007). Os desreguladores endócrinos interferem no funcionamento do sistema hormonal, mediante algum dos três mecanismos seguintes: substituindo os hormônios naturais; bloqueando a ação hormonal; aumentando ou diminuindo os níveis de hormônios naturais (Santamarta, 2001).

Atualmente dentre os diversos DE, a ação do Tributilestanho sobre organismos marinhos, especialmente sobre moluscos e gastrópodes, é bem documentada. No Brasil, por exemplo, são várias as pesquisas sobre o imposex, que pode ser definido como a masculinização de fêmeas de moluscos gastrópodes (Castro et al. 2000, Fernandez et al. 2002, Castro et al. 2005, Castro et al. 2007). Para bivalves, há evidências de que o TBT

pode causar alteração no sistema endócrino desses animais, no nível de 1 ng/L (Bisinoti e Jardim, 2004).

Mytella charruana* e *Mytilopsis leucophaeta

Dentro do filo Mollusca, a classe Bivalvia também denominada Pelecypoda ou Lamellibranchiata, é a segunda em número de espécies, depois dos Gastropoda, com cerca de 20.000 espécies viventes descritas (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006). São animais comprimidos lateralmente e possuem uma concha composta de duas valvas, encaixadas em dobradiça dorsalmente, que envolvem todo o corpo. Esta classe abriga animais bastante conhecidos e muitos de importância econômica, como mariscos, ostras e mexilhões (Ruppert e Barnes, 1996).

A família Mytilidae inclui os bivalves conhecidos como mexilhões verdadeiros, e são encontrados abundantemente em todo mundo. Caracterizam-se por apresentar concha de coloração escura e habitar substratos duros, geralmente rochas (Abbott et al. 2003). Esta família engloba diversas espécies de importância econômica no cenário mundial, como os gêneros *Mytilus*, *Perna* e *Mytella*.

Mytella charruana (Orbigny, 1842) (Figura 1.3) é conhecida popularmente como sururu, sendo encontrada no México, até Guiana, Equador, Galápagos, Venezuela, Suriname, Brasil, Uruguai e Argentina. Esta espécie é característica de ambientes entre marés lamosos e lagos rasos. É amplamente utilizada no nordeste do Brasil para alimentação. Medem em geral 50 mm de comprimento e 22 mm de largura, com concha de coloração marron-amarelada na parte anteroventral e esverdeada na parte dorsal. *M. falcata* (Orbigny, 1842), *M. arciformis* (Dall, 1909) e *M. mundahuensis* (Duarte, 1926) são considerados sinônimos desta espécie (Rios, 1985).



Figura 1.3. *Mytella charruana* coletada no estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco. A direita detalhe da coleta de *Mytella charruana* no estuário.

A família Dreissenidae é pequena, com aproximadamente 40 espécies encontradas em água doce e salobra. Os indivíduos desta família se caracterizam por apresentar uma concha longa e triangular, semelhante aos mitídeos (Tunnel et al. 2010) daí a denominação de "falsos mexilhões".

Mytilopsis leucophaeta (Figura 1.4a) é um bivalve exótico, conhecido localmente como marisco branco. É natural da América do Norte, sendo encontrado desde Nova Iorque ao México oriental (Abbott et al, 2000). Quando adultos os indivíduos dessa espécie medem cerca de 1.5 a 2.5 cm de comprimento, mas podem alcançar de 3.0 a 4.0 cm. Sua concha é alongada, pouco arredondada, e usualmente possui um edentação ventral-lateral distinta. A concha possui coloração acastanhada, com estrias grosseiras e periostraco muitas vezes solto ou laminar. A característica mais distinta de *M. leucophaeta* é a presença de uma apófise na parte inferior do septo (Figura 1.4b) (Mackie; Claudi, 2009).

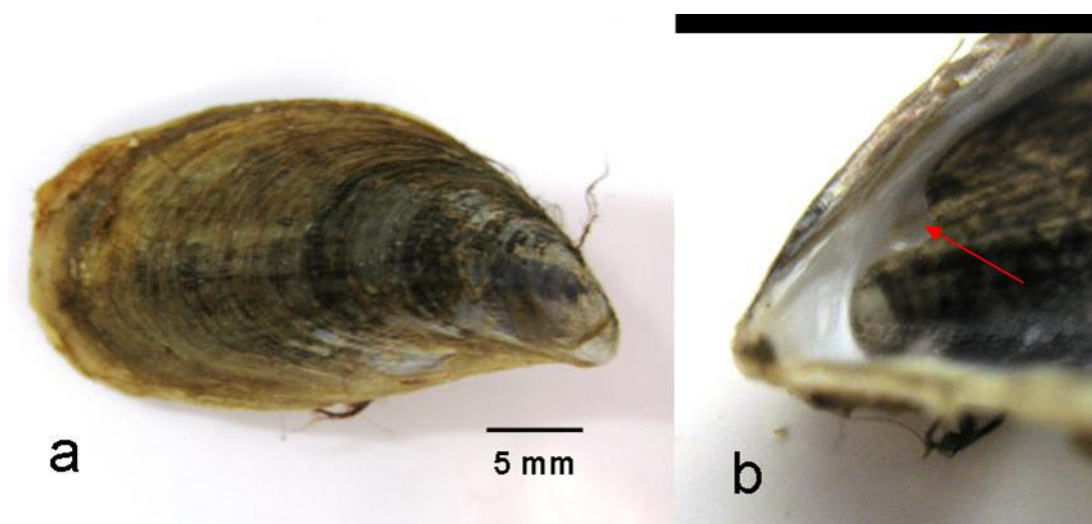


Figura 1.4. **(a)** *Mytilopsis leucophaeta* coletado no estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco. **(b)** No detalhe (seta) apófise característica dos animais desta espécie.

Bacia Hidrográfica do Rio Capibaribe e Bacia do Pina

A Bacia Hidrográfica do Rio Capibaribe possui cerca de 74 afluentes e banha 42 municípios pernambucanos, sendo os principais: Toritama, Santa Cruz do Capibaribe, Salgadinho, Limoeiro, Paudalho, São Lourenço da Mata e o Recife. O seu percurso no município do Recife, até o local onde ele se bifurca, passa por vários bairros: Várzea, Caxangá, Apipucos, Monteiro, Poço da Panela, Santana, Torre, Capunga, Derby, Madalena. Quando se bifurca o seu braço norte encontra-se com o rio Beberibe e deságua no mar. Seu braço sul, passa por Afogados, Ilha do Retiro, rumo a Ilha Joana Bezerra, juntando-se ao rio Tejiú e tendo a sua foz em pleno porto do Recife, alguns quilômetros da foz do braço norte (Machado, 2010).

O estuário do rio Capibaribe é formado pela confluência dos rios Tejiú, Jiquiá, Jordão, Pina e braço sul do Capibaribe, e está situado próximo ao porto do Recife ($08^{\circ}04'S$ e $34^{\circ}52'16''O$), sendo separado do oceano através de um dique natural de arenito (Santos et al, 2009). Ainda no estuário se encontra a Bacia do Pina (Figura 1.6), que está situada após a bacia portuária do Porto do Recife, em plena zona urbana da cidade e é separada do Oceano Atlântico por meio de um dique, o qual impede o contato direto de suas águas com as do mesmo. Possui uma extensão de aproximadamente 3,6 quilômetros e larguras variáveis, sendo a mínima de 0,26 quilômetros, e a máxima de 0,86 quilômetros, perfazendo uma área total de espelho d'água de aproximadamente 2,02 quilômetros quadrados (Araújo, 1999).

Trata-se de uma área estuarina bastante dinâmica do ponto de vista hidrográfico. Por ser uma área portuária, há um constante tráfego de embarcações, funcionando também como um verdadeiro reservatório para descarga de indústrias e efluentes de esgotos domésticos. Vem sendo constantemente degradado por meio de ações antrópicas, ao longo do tempo. Esses fatos fazem com que seu monitoramento se torne altamente necessário, a fim de estabelecerem medidas mitigatórias para mantê-lo o mais próximo possível de seu equilíbrio natural (Santos et al. 2009). Apesar da grande eutrofização, é uma área de grande importância socioeconômica devido a sua atuação pesqueira. Seus bancos intermareais apresentam grande produtividade, e são intensivamente explorados pela população local, especialmente para a captura de moluscos (Lima, 2003).



Figura 1.5. Fotografia aérea da Bacia do Pina-PE, Brasil. Fonte: Google Earth.

Diante do exposto, nos próximos capítulos será realizada uma abordagem sobre a biologia reprodutiva de *M. charruana* e *M. leucophaeta* e sobre os efeitos agudos e crônicos da exposição ao tributilestanho sobre estas duas espécies. As referências bibliográficas serão reunidas após o último capítulo.

Capítulo II

***Ciclo Reprodutivo de *Mytilopsis*
leucophaeta e *Mytella charruana* no
Estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco***

1.RESUMO

A biologia reprodutiva de *Mytilopsis leucophaeta* e *Mytella charruana* foi estudada ao longo de 12 meses entre 2009 e 2010 na região polihalina do complexo estuarino do Rio Capibaribe, com dois pontos de coleta na Bacia do Pina. Foram coletados 20 indivíduos adultos de cada espécie mensalmente na região inferior do mediolitoral de substratos consolidados. Os animais foram mensurados e fixados em solução de Davidson por 48h e depois conservados em etanol 70%, sendo posteriormente processados histologicamente. Após a análise histológica das gônadas concluiu-se que a reprodução de *M. leucophaeta* e *M. charruana*, no estuário do rio Capibaribe, é contínua e assincrônica. Entretanto, *M. leucophaeta* apresentou dois períodos de intensa atividade de desova, outubro de 2009 e agosto de 2010 e três períodos de intensa atividades de proliferação dos gametas, dezembro de 2009 e janeiro e março de 2010. Já para *Mytella charruana* os dois periodos de desova mais intensa foram abril e agosto de 2010, e janeiro e julho de 2010 os periodos de maior proliferação de gametas. As variações ambientais influenciam parcialmente o ciclo reprodutivo de *M. leucophaeta*, com a temperatura explicando 34% da variação do índice gonadal médio (IGM). Por outro lado, não houve correlação entre o ciclo reprodutivo de *M. charruana* e a temperatura ou salinidade. Houve um predomínio de fêmeas, na maioria dos meses, para as duas espécies, mas a diferença na razão entre os dois sexos não foi significativa para *M. leucophaeta* e foi significativa para *M. charruana*. Foram observados indivíduos de *M. leucophaeta* com intersex, indicando que a população possivelmente está sendo afetada por poluentes capazes de causar alterações no sistema endócrino desta espécie.

2. INTRODUÇÃO

O conhecimento da estratégia reprodutiva das espécies consiste em determinar os estágios do ciclo reprodutivo em diversos locais, e assim verificar as diferenças que podem estar relacionadas com variações ambientais (Barnabé, 1994). Os bivalves são moluscos com ampla distribuição geográfica. A plasticidade de algumas espécies permite que as mesmas habitem ambientes com características distintas. Neste sentido, vários estudos têm sido realizados para descrever o ciclo reprodutivo e o período de desova de uma população em uma determinada área geográfica (Sastry, 1963). Estudos sobre a reprodução são importantes dentro da ecologia, pois fornecem dados

importantes relacionados à distribuição e estrutura populacional e também por possibilitar predições referentes ao recrutamento da população (Bayne, 1976).

Os bivalves em geral, possuem um sistema reprodutivo simples, a maioria é dióica ou gonocórica, e os gametas são descarregados através dos ductos gonadais dentro da cavidade do manto e conseqüentemente na água circundante, ocorrendo então a fertilização e desenvolvimento externos (Purchon, 1977). Bivalves marinhos bentônicos têm um padrão cíclico de reprodução, que podem ser dividido em três fases: gametogênese e vitelogênese, reprodução e fertilização, e desenvolvimento larval e crescimento. Cada espécie possui uma grande variedade de mecanismos adaptativos, tanto genéticos e não genéticos, que coordenam os eventos durante a reprodução, a fim de maximizar o sucesso reprodutivo (Newell et al. 1982). A importância de se adquirir conhecimento em reprodução relaciona-se com a necessidade de um estudo adequado da história de vida das diversas espécies de moluscos e sua pertinência com o manejo adequado e a conservação (Marques, 2004).

Entre os bivalves, os mexilhões têm sido freqüentemente relatados como espécies exóticas invasoras, especialmente os mitilídeos e dreissenídeos, devido sua alta fecundidade, rápido crescimento, um curto período de vida e uma boa capacidade de dispersão através da dispersão larval (Wangkulangkul 2009).

O mitilídeo *Mytella charruana* é uma espécie nativa da América do Sul, encontrado ao longo do estuário do rio Capibaribe, e amplamente utilizado pela população ribeirinha local como fonte de alimentação. *Mytilopsis leucophaeta* é uma espécie exótica e teve seu primeiro registro de ocorrência no Brasil em uma região estuarina adjacente ao porto do Recife, Pernambuco (Souza et al, 2005), e juntamente com *M. charruana* ocupa substratos consolidados no limite médio-infralitoral, na região polihalina do estuário.

O registro da ocorrência de *M. leucophaeta* em Recife, Pernambuco, indica a necessidade de estudos para determinar o impacto causado por essa espécie no ambiente, bem como a fauna nativa do mesmo. Entretanto, pouco se sabe sobre a história de vida desses animais (Verween, et al. 2009) e estudos sobre o ciclo de vida dos mesmos no Brasil são inexistentes. Segundo Adiyodi e Adiyodi, (1988), o conhecimento sobre o ciclo reprodutivo de espécies de importância econômica, como o sururu, por exemplo, é fundamental para aplicação de um manejo e cultivo adequados.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar aspectos da biologia reprodutiva, bem como a descrever o ciclo reprodutivo anual de *M. charruana* e *M. leucophaeta* no estuário do rio Capibaribe.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Vinte indivíduos de cada espécie foram coletados mensalmente, de forma manual, com auxílio de luvas e espátula em dois pontos da Bacia do Pina. Indivíduos de *M. leucophaeta* foram coletados no ponto um (P1) (8°4'46.44''S e 34°53'26.48''O) (Figura 2.1) no período de setembro de 2009 a agosto de 2010 e *M. charruana* no ponto dois (P2) (8°4'23.99''S e 34°52'48.02''O) (Figura 2.1), entre outubro de 2009 a setembro de 2010. A temperatura e salinidade da água em cada local foram registradas com o auxílio de um termômetro e um refratômetro, respectivamente.

Após coletados, os animais foram acondicionados em sacos plásticos e transferidos para o laboratório de comunidades marinhas (LACMAR) da Universidade Federal de Pernambuco, onde tiveram o comprimento ântero-posterior e largura da concha mensurados com auxílio de um paquímetro (0,01mm). Posteriormente, os animais tiveram as partes moles removidas com auxílio de um bisturi, que foram colocadas em cassetes histológicos identificados.

Os animais foram fixados em solução de Davidson por 48h (3 partes de água do mar + 3 partes de álcool absoluto + 2 partes de formaldeído 40% + 1 parte de ácido acético glacial + 1 parte de glicerina). Após a fixação, os animais foram conservados em álcool 70%. O material biológico foi processado histologicamente, sendo desidratado em série crescente de Etanol, diafanizado em Xilol e impregnado em parafina (54-56°C). Depois de impregnados, os blocos, foram incluídos em parafina (56-58°C). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 5 µm de espessura com auxílio de micrótomo e navalha de aço. Posteriormente, os cortes foram submetidos à coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE). Os cortes dos blocos e a rotina de coloração foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Ultra-estrutura do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães.



Figura 2.1. Locais de coleta na Baía do Pina, Pernambuco, durante Agosto de 2009 a Setembro de 2010. P1 ($8^{\circ}4'46.44''S$ e $34^{\circ}53'26.48''O$) e P2 (P2) ($8^{\circ}4'23.99''S$ e $34^{\circ}52'48.02''O$). Fonte: Google Earth. 20.12.2010.

Os estágios de desenvolvimento gonadal foram estabelecidos baseado nas classificações adotadas Maia et al. (2005) e Barreira e Araújo (2005):

Estágio I – Indiferenciado: gônada preenchida por tecido germinativo indiferenciado e grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo, não sendo possível a determinação do sexo. Ausência de gametas residuais e escassas células germinais.

Estágio II – Gametogênese Inicial: Os folículos estão ocupados pelos estados primários da gametogênese. Nos machos observam-se nas paredes dos folículos espermatogônias, que por divisão originam espermatócitos, espermatídes e espermatozóides, ocupando o centro do folículo. Neste estado de maturação a gônada feminina apresenta ovogônias, ovócitos em fases iniciais de desenvolvimento (Ovócito I e II), e ovócitos pedunculados, ligados à parede do folículo por um pedúnculo citoplasmático.

Estágio III – Gametogênese Avançada: aumento do diâmetro dos folículos e pela diminuição do tecido conjuntivo interfolicular. Dentro dos folículos observa-se uma coexistência de gametas em diferentes estados de maturação. Nos machos observa-se um aumento na quantidade de espermatozóides no centro do folículo. Nas fêmeas, a maioria dos oócitos encontra-se ainda ligados à parede dos folículos por um pedúnculo.

Presença de alguns ovócitos em fases iniciais de desenvolvimento e de ovócitos maduros.

Estágio IV – Maturação: Os folículos apresentam o seu diâmetro máximo, ocupando praticamente toda a gônada e encontram-se repletos de gametas maduros. Apesar desta fase caracterizar o fim da gametogênese ainda se observam, em ambos os sexos, células sexuais em diferentes estados de desenvolvimento. Diminuição da camada germinativa mais externa nos machos e fêmeas com ovócitos maduros soltos no lúmen.

Estágio V – Desova parcial: redução do diâmetro dos folículos acompanhada por um aumento do tecido conjuntivo interfolicular. Nos machos há presença de espaços vazios dentro dos folículos. Nas fêmeas, esta fase se caracteriza pela presença de espaços no centro dos folículos, com os ovócitos maduros espalhados em seu interior.

Estágio VI – Desova Total: acentuada proliferação do tecido conjuntivo interfolicular e pela presença de numerosos hemócitos. Presenças de ovócitos e espermatozóides residuais.

Modificado de Verwenn et al. (2005), o índice gonadal médio (IGM) foi calculado para cada amostra de acordo com a fórmula:

$$IGM = \frac{\sum [1 * (n^{\circ} \text{ ind estágio } 1) + 2 * (n^{\circ} \text{ ind estágio } 2) + \dots + n * (n^{\circ} \text{ ind estágio } n)]}{n^{\circ} \text{ de ind. na amostra}}$$

Este índice está associado à condição reprodutiva da população num determinado período, uma diminuição no índice indica que os indivíduos estão em período de desova, enquanto um aumento indica o período de desenvolvimento gonadal (Ávila et al. 2008). Para o cálculo do índice foi atribuído uma pontuação aos estágios de desenvolvimento gonadal. Considerou-se o período de indiferenciação sexual como estágio 0, desova total como estágio 1, desova parcial estágio 2, gametogênese inicial como estágio 3, gametogênese avançada 4 e maturação como estágio 5.

O teste de Correlação foi utilizado para verificar o grau de associação entre os parâmetros abióticos com o índice gonadal médio (IGM). Diferenças na proporção sexual foram testadas através do qui-quadrado (χ^2). As análises foram realizadas através do programa STATISTICA® versão 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros Abióticos

A temperatura da água, no ponto de coleta de *M. leucophaeta* (P1), variou de 26 a 31 °C, sendo o mês de março de 2010 o mais quente. A salinidade variou de 21 a 36, sendo o primeiro valor registrado no mês de março de 2010 e o segundo no mês de setembro de 2009 (Figura 2.2).

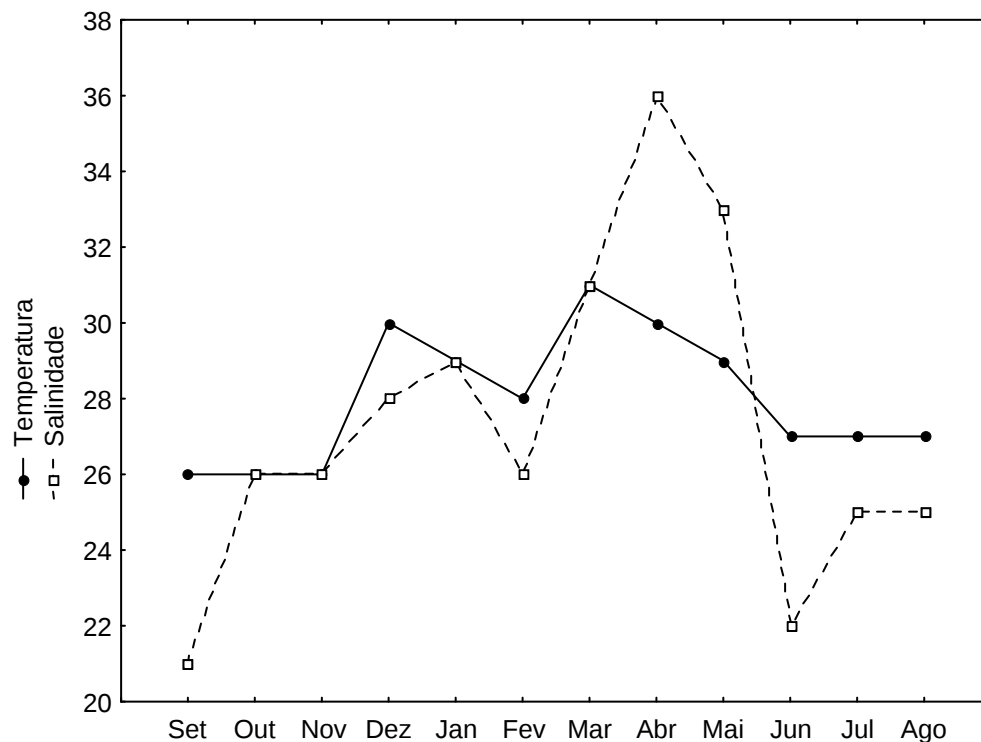


Figura 2.2. Variação dos parâmetros abióticos, Temperatura (°C) e Salinidade entre os meses de setembro de 2009 a agosto de 2010 no ponto um (P1) da Bacia do Pina, Pernambuco.

A temperatura no ponto dois (P2), local de coleta de *M. charruana*, variou de 20 °C em junho de 2010 a 29,5 em fevereiro deste mesmo ano. A salinidade variou de 30 no mês de outubro de 2009 a 10 em julho de 2010 (Figura 2.3).

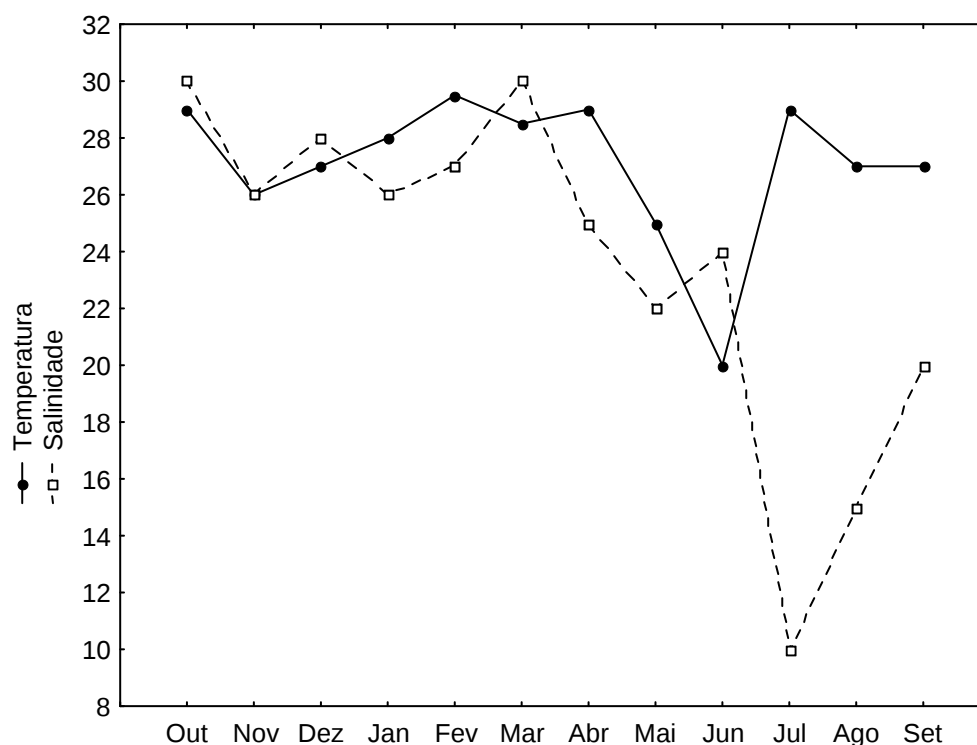


Figura 2.3. Variação dos parâmetros abióticos, Temperatura (°C) e Salinidade entre os meses de Outubro de 2009 a Setembro de 2010 no ponto dois (P2) da Bacia do Pina, Pernambuco.

4.2 Variação no Tamanho e Razão Sexual

4.2.1 *Mytilopsis leucophaeta*

Os indivíduos de *M. leucophaeta* coletados tiveram em média 25,66 mm de comprimento e 13,36 mm de largura. Os animais de maior tamanho foram coletados em Outubro de 2009, com média aproximadamente de 30 mm de comprimento e 16 mm de largura, enquanto que o mês de Dezembro de 2009 apresentou indivíduos com as menores medidas, com média de 23 mm de comprimento e 14 mm de largura (Figura 2.4). Indivíduos de *M. leucophaeta* geralmente atingem a maturidade sexual aos 7 mm de comprimento (Jenner et al. 1998).

Dos indivíduos coletados, 89 foram do sexo masculino, 131 do sexo feminino e 20 apresentaram gônadas indiferenciadas não permitindo a identificação do sexo, com a razão M/F diferindo ao longo do ano significativamente de 1:1 ($\chi^2 = 6,882$, $p < 0,008$). O maior número de fêmeas prevaleceu na maioria dos meses amostrados, com exceção dos meses de novembro de 2009 e janeiro e março de 2010, no quais a razão sexual

macho/fêmea foi 1,83; 1,25 e 2,16, respectivamente. Entretanto, o único mês que apresentou razão significativamente diferente de 1:1 foi julho ($\chi^2 = 4,263$, $p < 0,03$) (Figura 2.5).

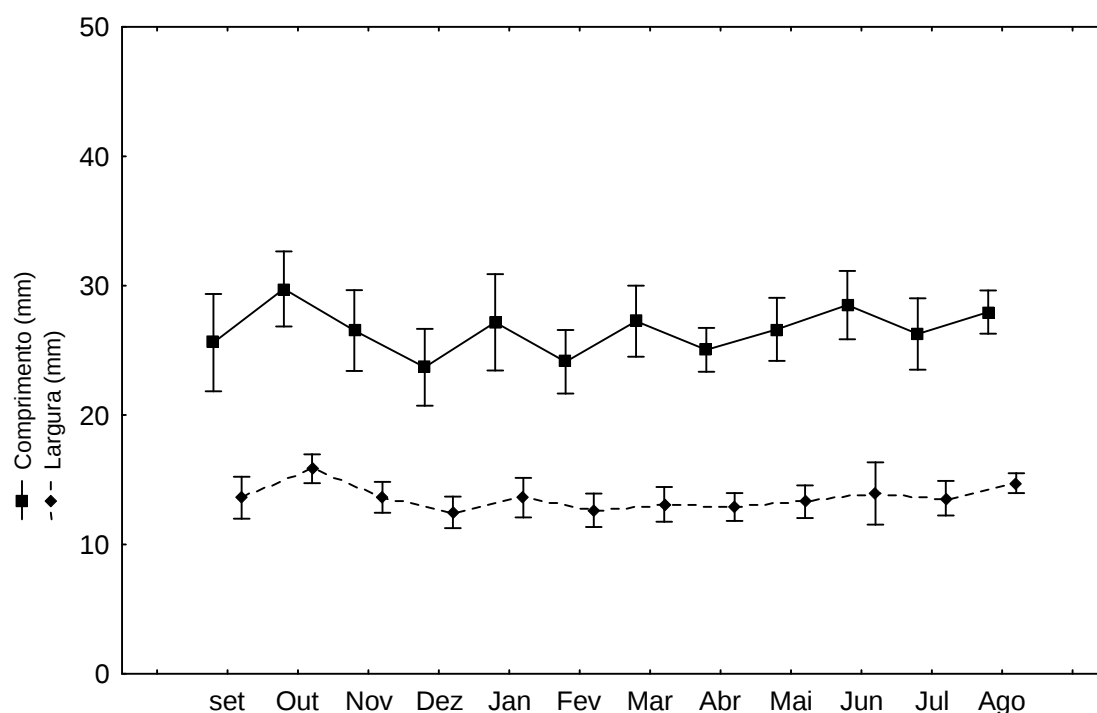


Figura 2.4 Média e desvio padrão do comprimento e largura da concha de *Mytilopsis leucophaeta* coletados na Bacia do Pina, Pernambuco, no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010.

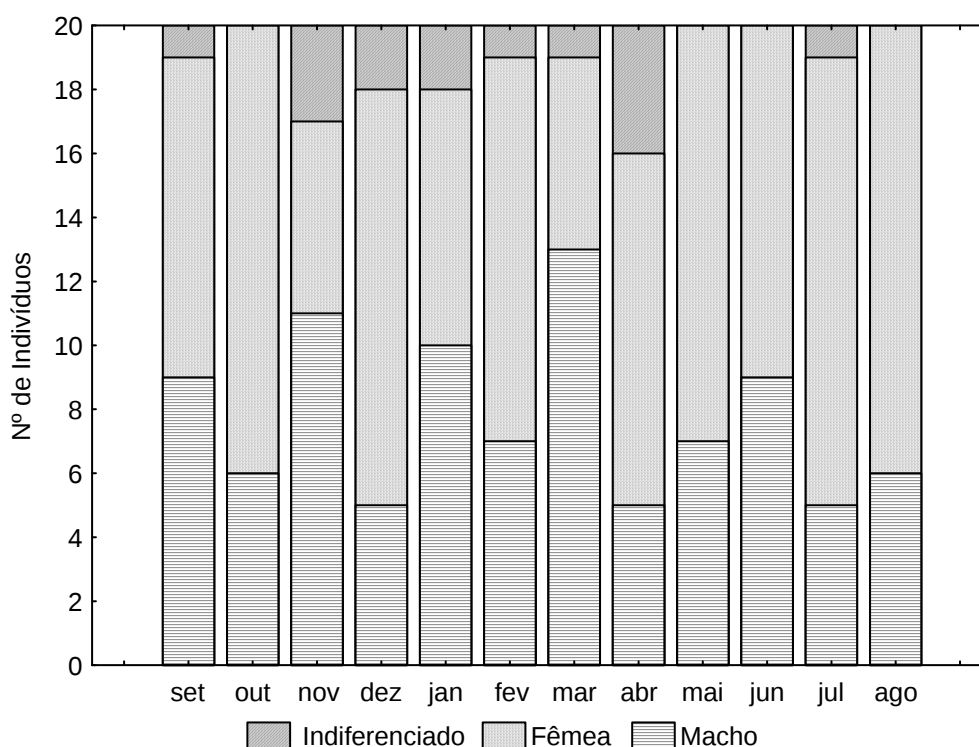


Figura 2.5 Número de machos, fêmeas e indiferenciados de *Mytilopsis leucophaeta* coletados na Bacia do Pina, Pernambuco durante os meses de setembro de 2009 a agosto de 2010.

Tabela 1. Razão sexual Macho/ Fêmea (M/F) de *Mytilopsis leucophatea* durante os meses de setembro de 2009 a agosto de 2010.

<i>Mês</i>	<i>M/F</i>	χ^2	<i>P (0,05)</i>	<i>Mês</i>	<i>M/F</i>	χ^2	<i>P (0,05)</i>
Set	0,9	0,05	0,81	Mar	2,16	2,57	0,10
Out	0,42	3,2	0,07	Abr	0,45	1,6	2,25
Nov	1,83	1	0,31	Mai	0,53	1,8	0,17
Dez	0,38	3,55	0,06	Jun	0,81	0,2	0,66
Jan	1,25	0,25	0,61	Jul	0,35	4,27	0,04
Fev	0,58	1,31	0,25	Ago	0,42	3,2	0,07

4.2.2 *Mytella charruana*

A média de comprimento da concha dos indivíduos de *M. charruana* coletados durante o estudo foi de 33,08 mm e 15,55 mm de largura. Os indivíduos de maior tamanho foram coletados nos meses de Outubro e Novembro de 2009, enquanto que as menores medidas foram observadas em indivíduos coletados em Março de 2010 (Figura 2.6). Segundo Stenyakina et al. (2010) indivíduos de *M. charruana* com cerca de 15 mm de comprimento são sexualmente maduros.

Do total de 240 indivíduos analisados, foram identificados 55 machos, 182 fêmeas e 3 indivíduos indiferenciados (Figura 2.7), devido à presença de parasitas no tecido gonadal (Figura 2.8). A razão sexual durante o período em estudo foi 0,267, diferindo significativamente ao longo do ano ($\chi^2=6,782$; $p < 0,01$), com exceção dos meses de maio ($\chi^2= 0,8$; $p > 0,37$) e julho ($\chi^2=1,8$; $p > 0,17$) (Tabela 2). Havendo, portanto maior número de fêmeas no período amostrado.

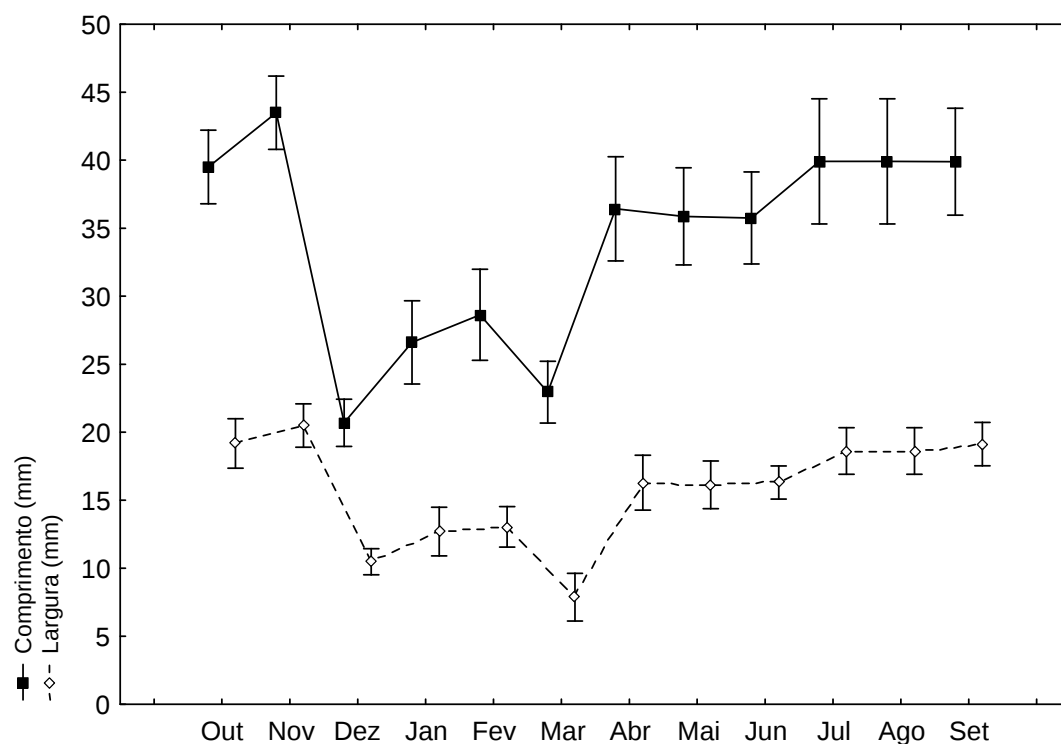


Figura 2.6. Média e desvio padrão do comprimento e largura da concha de *Mytella charruana* coletados na Bacia do Pina, Pernambuco, no período de outubro de 2009 a setembro de 2010.

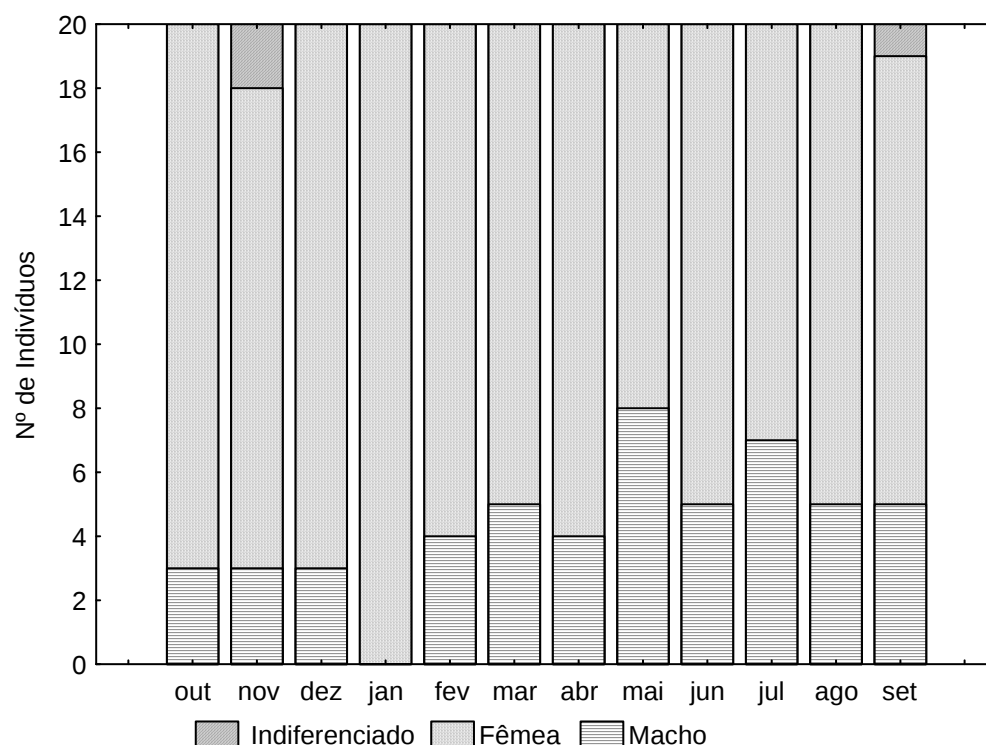


Figura 2.7 Número de machos, fêmeas e indiferenciados de *Mytella charruana* coletados na Bacia do Pina, Pernambuco durante os meses de Setembro de 2009 a Agosto de 2010.

Tabela 2. Razão sexual Macho/ Fêmea (M/F) de *Mytella churruana* durante os meses de amostragem.

Mês	M/F	χ^2	P (0,05)	Mês	M/F	χ^2	P (0,05)
Out	0,17	9,8	0,001	Abr	0,25	7,2	0,007
Nov	0,2	8	0,004	Mai	0,66	0,8	0,37
Dez	0,17	9,8	0,001	Jun	0,33	5	0,02
Jan	0	20	<0,001	Jul	0,53	1,8	0,17
Fev	0,25	7,2	0,007	Ago	0,33	5	0,02
Mar	0,33	5	0,02	Set	0,35	4,26	0,03

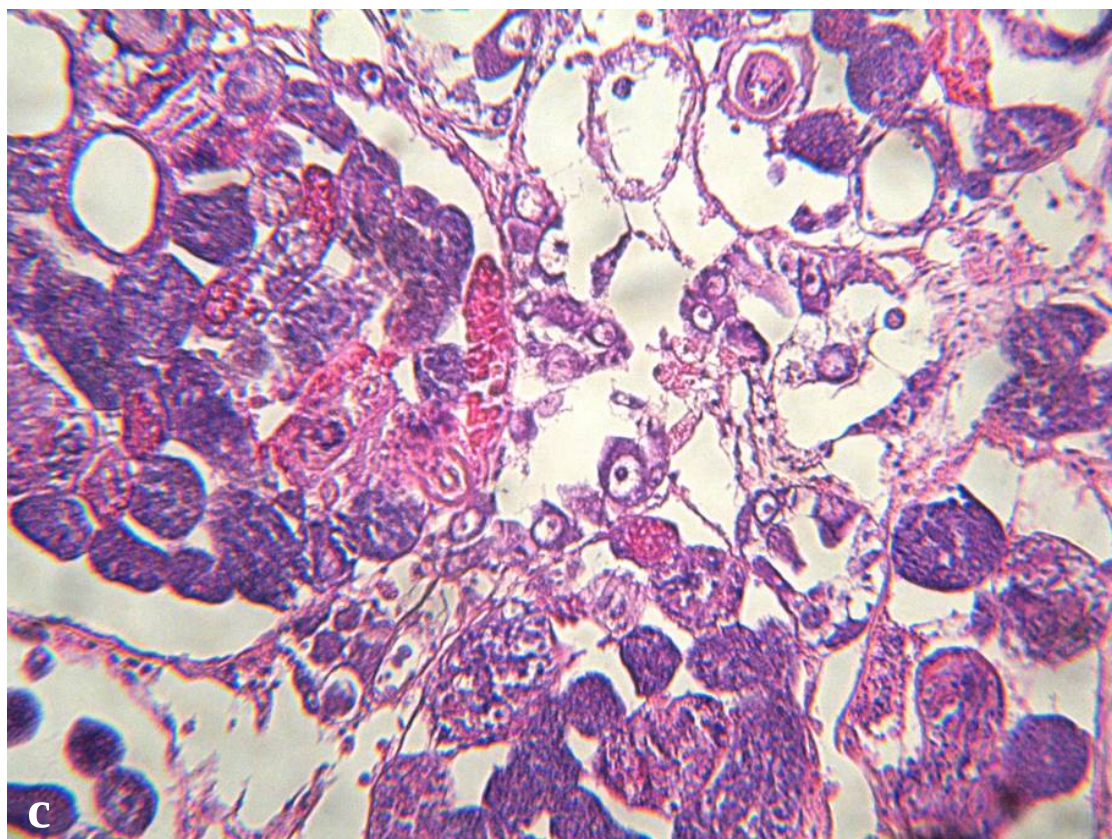
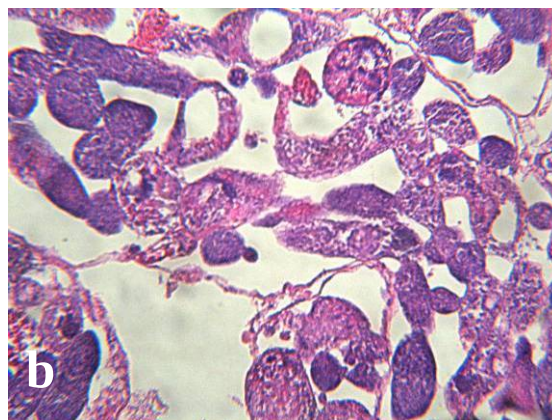
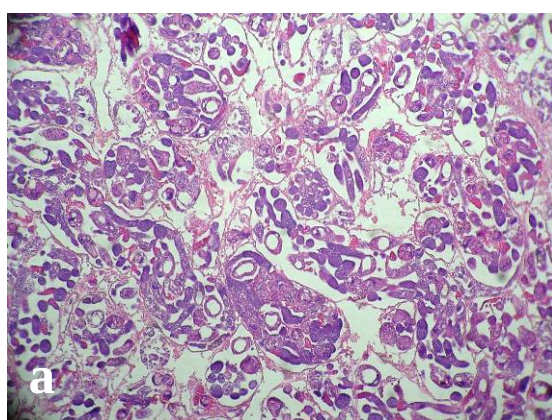


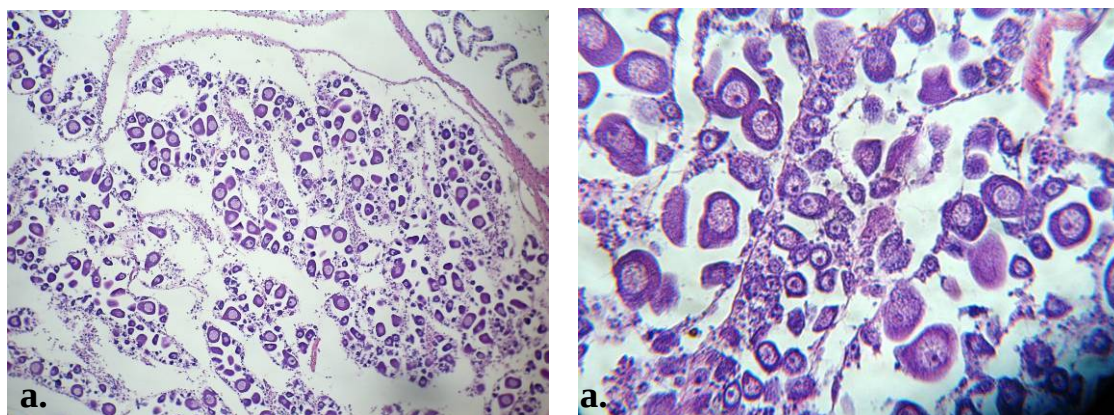
Figura 2.8. (a e b) Indivíduo de *Mytella charruana* de sexo indiferenciado devido à presença de parasitas no tecido gonadal. Em (c) observa-se uma fêmea com castração quase que total devido à presença de parasitas. (a) aumento de 10x e (b e c) de 40x.

4.3 Estágios de Desenvolvimento Gonadal e Ciclo Reprodutivo

4.3.1 *Mytilopsis leucophaeta*

Os estágios de desenvolvimento gonadal de *M. leucophaeta* foram identificados baseados naqueles descritos no material e métodos deste trabalho e podem ser visualizados na figura 2.9, na qual se observa o tecido gonadal de fêmeas e 2.10, na qual se observa o tecido gonadal de machos. De acordo com Assis (1985) os estágios do ciclo reprodutivo não podem ser determinados como fases estáticas, mas devem ser visualizados como processos dinâmicos e contínuos, neste sentido a caracterização dos estágios gonadais foram efetuadas pela dominância de determinado aspecto.

Em todos os meses foram observadas nos indivíduos de *M. leucophaeta* mais de uma fase da maturação sexual, com exceção do mês de outubro, no qual todos os indivíduos estavam em estágio de desova parcial e total e dezembro com todos os indivíduos em gametogênese inicial e avançada, sem nenhum período discreto de desenvolvimento ou desova (Figura 2.11). Foram identificados dois períodos de intensa atividade na proliferação dos gametas, entre dezembro e janeiro e em março. Dois períodos de desova se destacaram, de setembro a novembro de 2009, e em agosto de 2010. O mês de novembro apresentou o maior número de indivíduos com indiferenciação sexual, isto pode estar relacionado com o fato deste período suceder a desova, podendo então os indivíduos estarem em fase de repouso sexual.



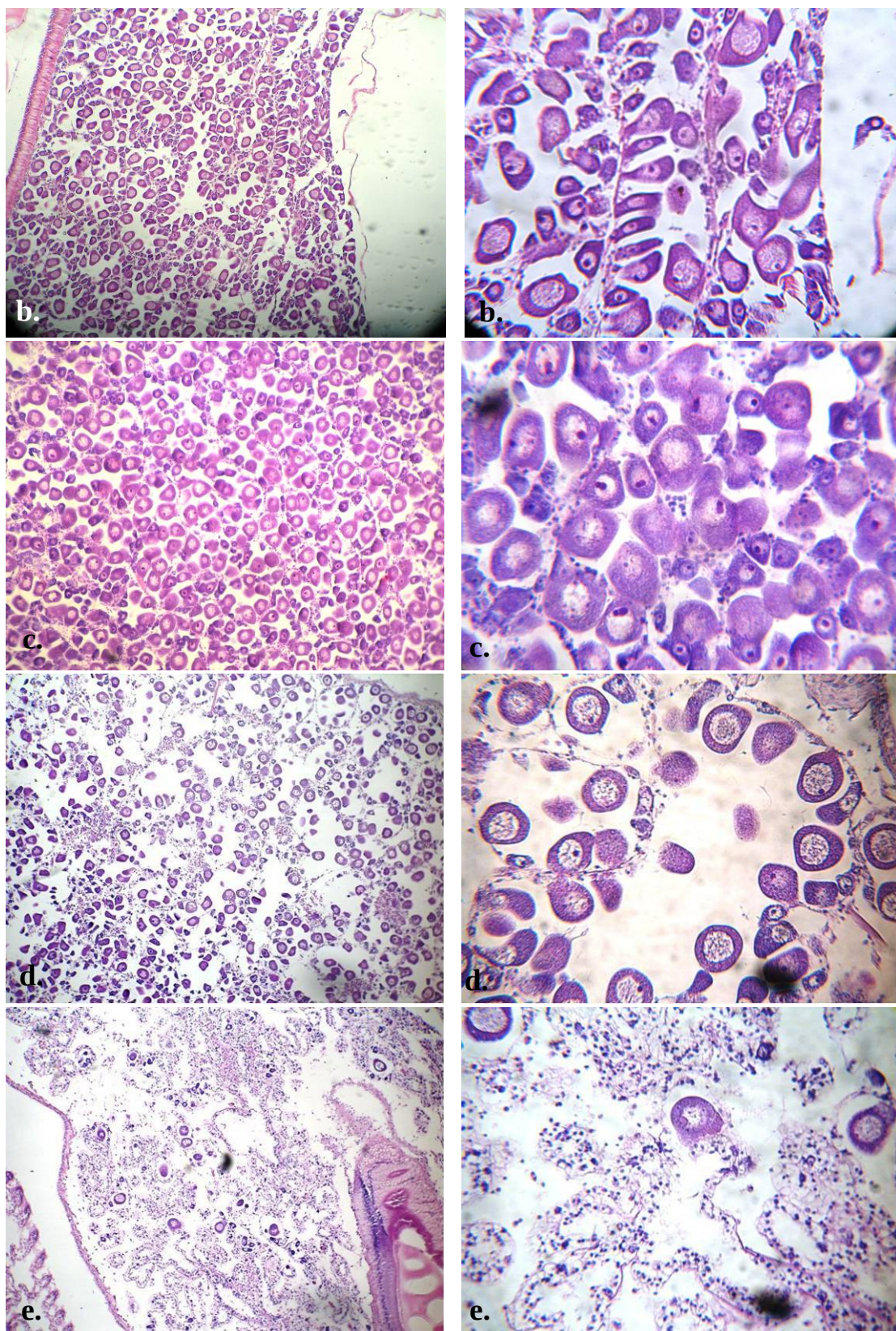
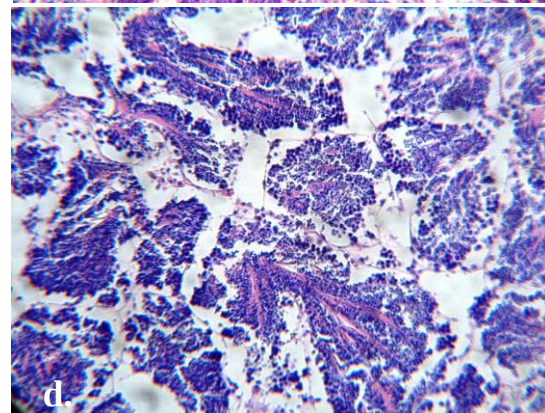
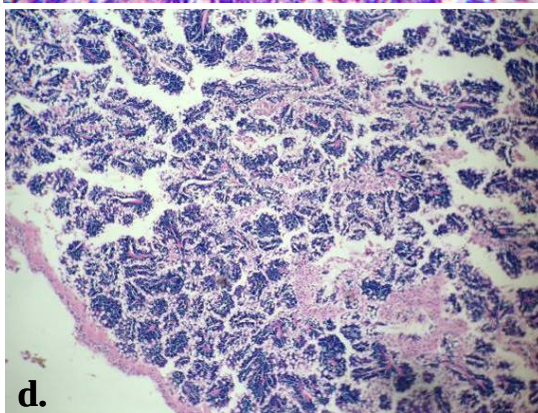
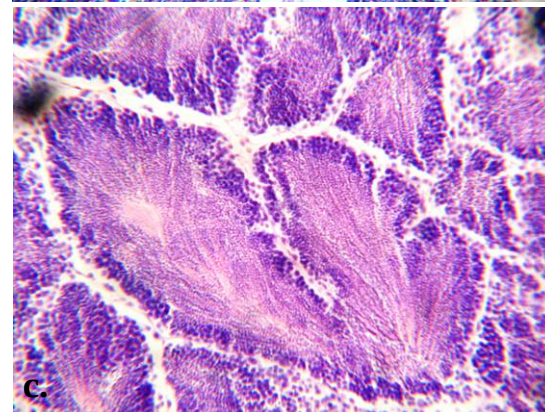
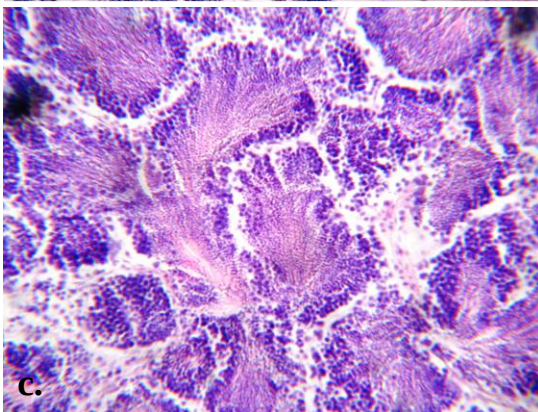
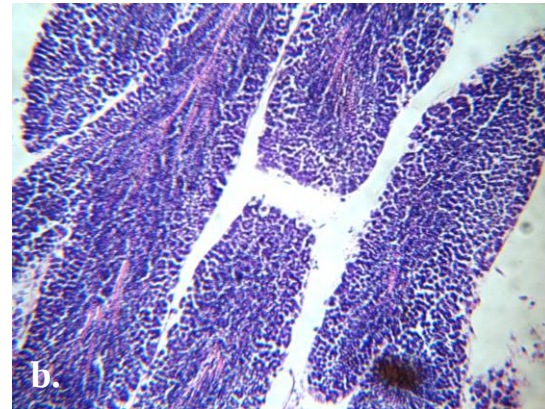
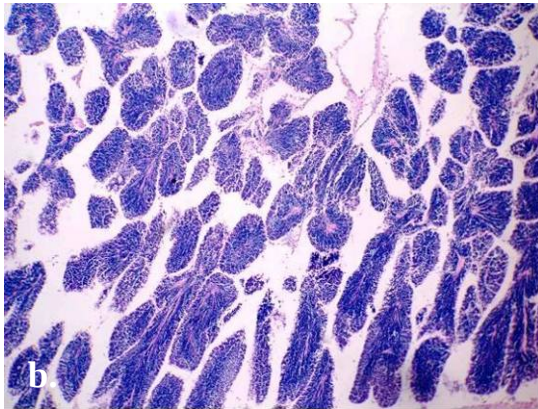
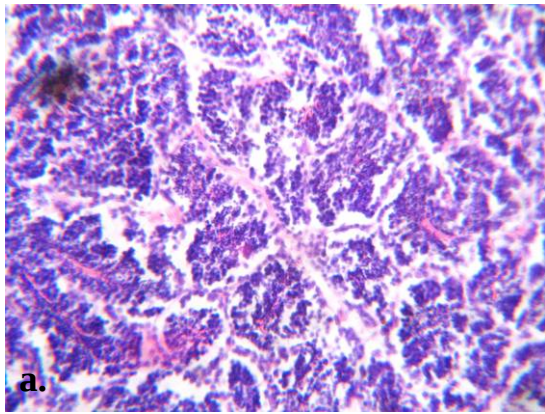
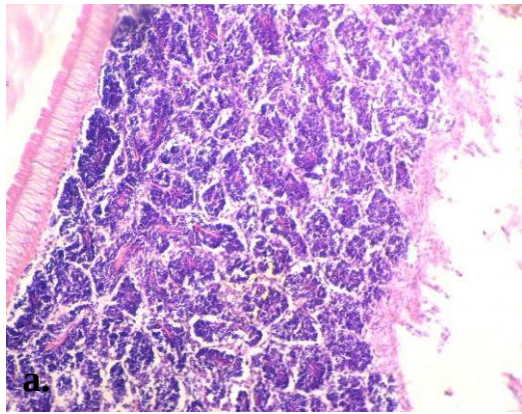


Figura 2.9. Estágios de desenvolvimento gonadal em fêmeas de *Mytilopsis leucophaeta* coletados na bacia do Pina, Pernambuco durante setembro de 2009 a agosto de 2010. (a.) Gametogênese inicial. (b.) Gametogênese avançada. (c.) Maturação. (d.) Desova parcial. (e.) Desova total. Figuras a esquerda aumento 10x e a direita aumento de 40x.



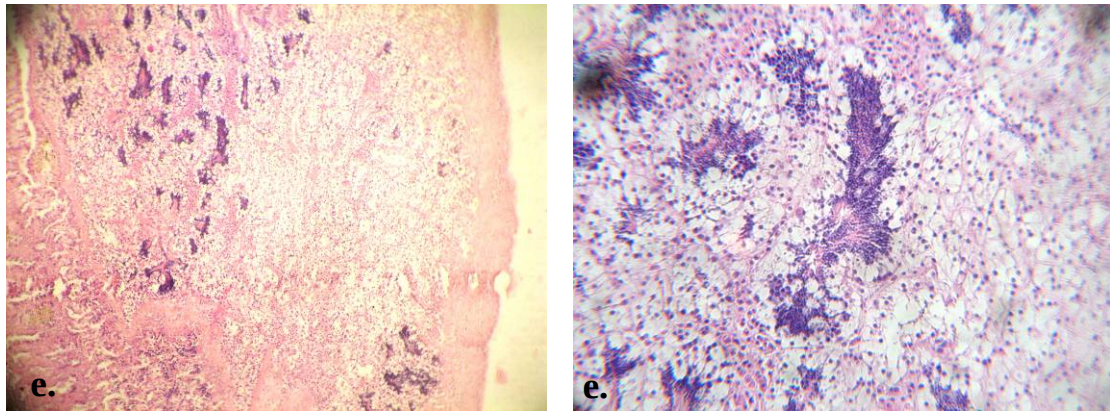


Figura 2.10. Estágios de desenvolvimento gonadal em machos de *Mytilopsis leucophaeta* coletados na bacia do Pina, Pernambuco durante setembro de 2009 a agosto de 2010. (a.) Gametogênese inicial. (b.) Gametogênese avançada. (c.) Maturação. (d.) Desova parcial. (e.) Desova total. Figuras a esquerda aumento 10x e a direita aumento de 40x.

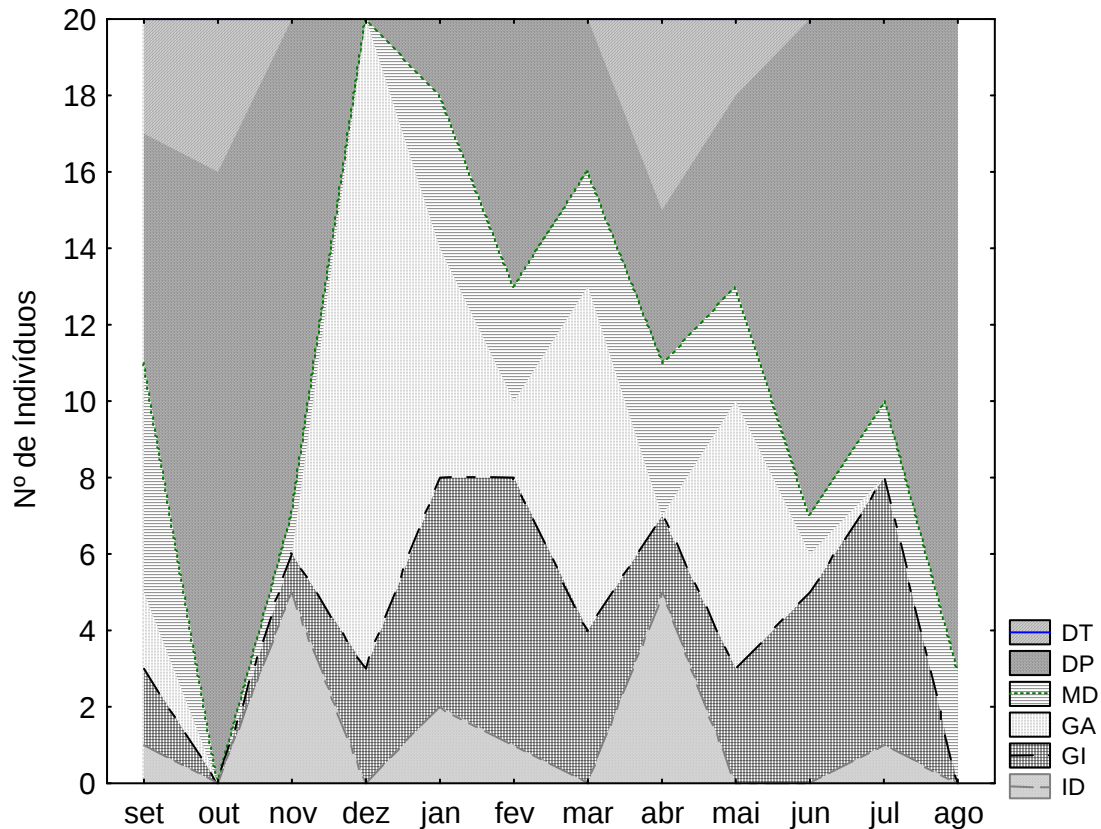
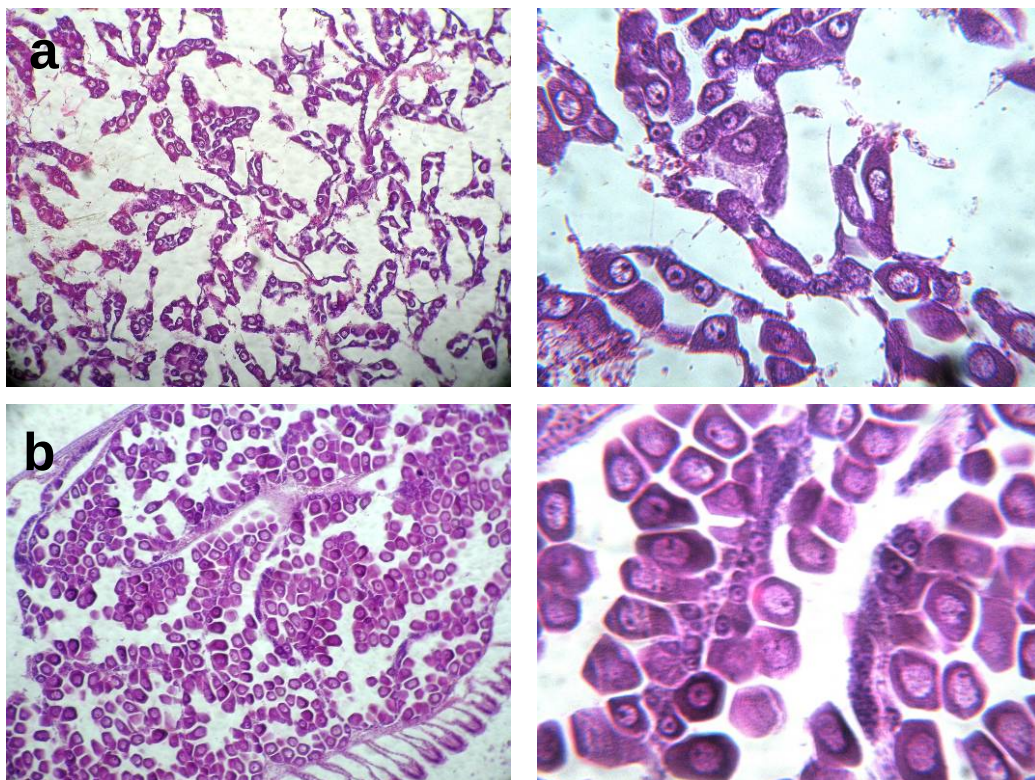


Figura 2.11. Estágios gonadais de *Mytilopsis leucophaeta* na Bacia do Pina, Pernambuco, entre Setembro de 2009 a Agosto de 2010 (n mensal= 20 indivíduos). DT=Desova total, DP= Desova Parcial, MD= Maduro, GA= Gametogênese avançada, GI= Gametogênese inicial e ID= indiferenciado.

4.3.2 *Mytella charruana*

As fases de desenvolvimento gonadal de *M. charruana* foram determinadas com base na mesma classificação adotada para *M. leucophaeta*. Foram identificados todos os estágios para as fêmeas de *M. charruana* (Figura 2.12), contudo para os machos não foram observados os estágios de gametogênese e desova total (Figura 2.13). Vale ressaltar que o mês onde se observou o maior número de indivíduos em gametogênese, todos os indivíduos da amostra foram do sexo feminino, o que pode ter contribuído para a não identificação de machos nesse estágio no período de estudo.

Observou-se ao longo do estudo a presença de indivíduos em desova em praticamente todos os meses, com exceção de janeiro de 2010, no qual 50% dos indivíduos apresentaram as gônadas em estágio de gametogênese e 50% maduros. O maior número de indivíduos maduros foi observado no mês de Julho de 2010. Durante o período em estudo foi possível identificar alguns períodos principais de desova, Outubro e Dezembro de 2009 e Abril e Agosto de 2010 (Figura 2.14).



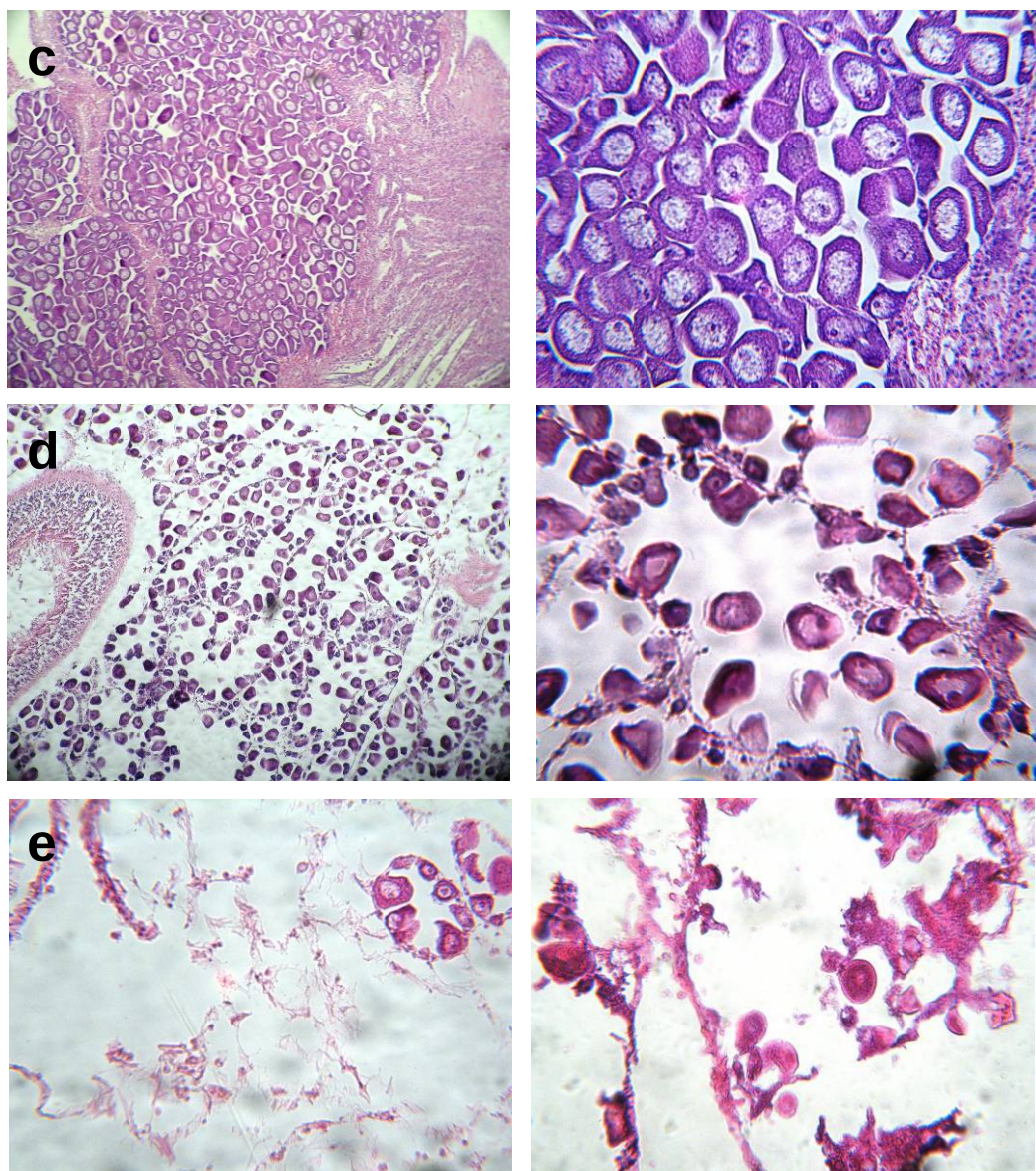
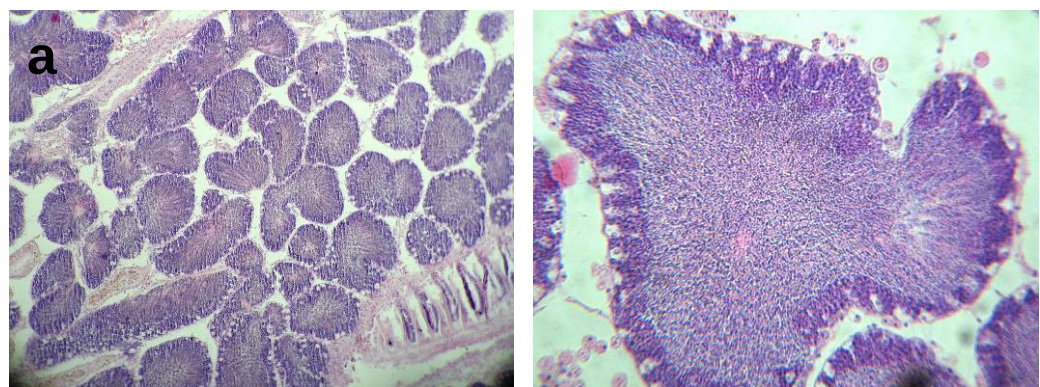


Figura 2.12. Estágios de desenvolvimento gonadal em fêmeas de *Mytella charruana* coletados na bacia do Pina, Pernambuco durante outubro de 2009 a setembro de 2010. (a.) Gametogênese inicial. (b.) Gametogênese avançada. (c.) Maturação. (d.) Desova parcial. (e.) Desova total. Figuras a esquerda aumento 10x e a direita aumento de 40x.



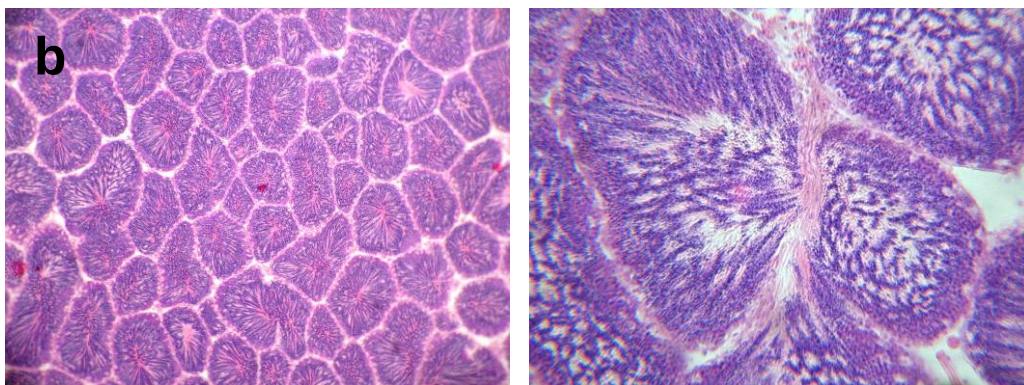


Figura 2.13. Estágios de desenvolvimento gonadal em machos de *Mytella charruana* coletados na bacia do Pina, Pernambuco durante outubro de 2009 a setembro de 2010. (a.) Maturação. (b.) Desova parcial. Figuras a esquerda aumento 10x e a direita aumento de 40x.

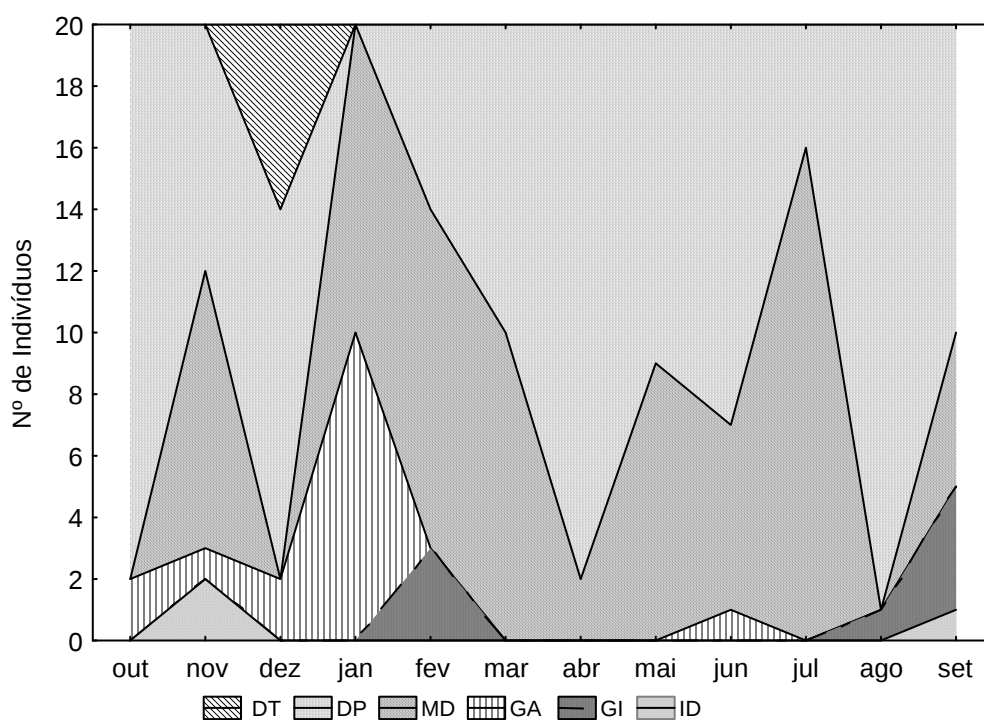


Figura 2.14. Estágios gonadais de *Mytella charruana* na Bacia do Pina, Pernambuco, entre Outubro de 2009 a Setembro de 2010 (n mensal= 20 indivíduos). DT=Desova total, DP= Desova Parcial, MD= Maduro, GA= Gametogense avançada, GI= Gametogense inicial e ID= indiferenciado.

4.4 Índice Gonadal Médio

O índice gonadal médio (IGM) de *M. leucophaeta* apresentou os menores valores para os meses de Outubro de 2009 e Abril e Agosto de 2010, 0,8, 1,4 e 1,6

respectivamente. Os maiores valores do IGM foram registrados em Dezembro, 3,85 e em Março 3,0 (Figura 2.15). A correlação entre o IGM e a temperatura foi significativa ($r = 0,5875$; $p < 0,05$), indicando que 34% da variação do IGM de *M. leucophaeta* pode ser explicado pela temperatura. Já a correlação IGM e Salinidade não foi significativa ($r = 0,1334$, $p > 0,05$).

Para *M. charruana* o índice gonadal médio (IGM) variou de 0,9 em Agosto a 4,75 em Julho (Figura 2.16). A correlação do IGM com os parâmetros ambientais Temperatura e Salinidade não foi significativa ($r = 0,0896$, $p > 0,78$) e ($r = -0,1963$, $p > 0,54$) respectivamente.

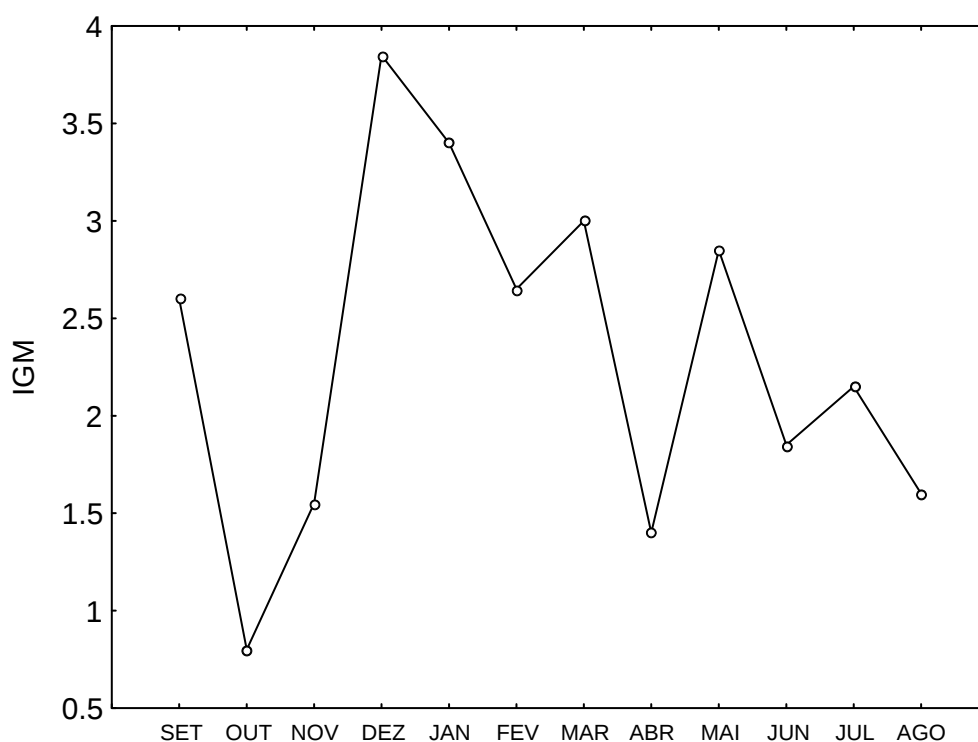


Figura 2.15. Variação do Índice Gonadal Médio (IGM) de *Mytilopsis leucophaeta* coletados na Bacia do Pina, Pernambuco entre os meses de setembro de 2009 e agosto de 2010.

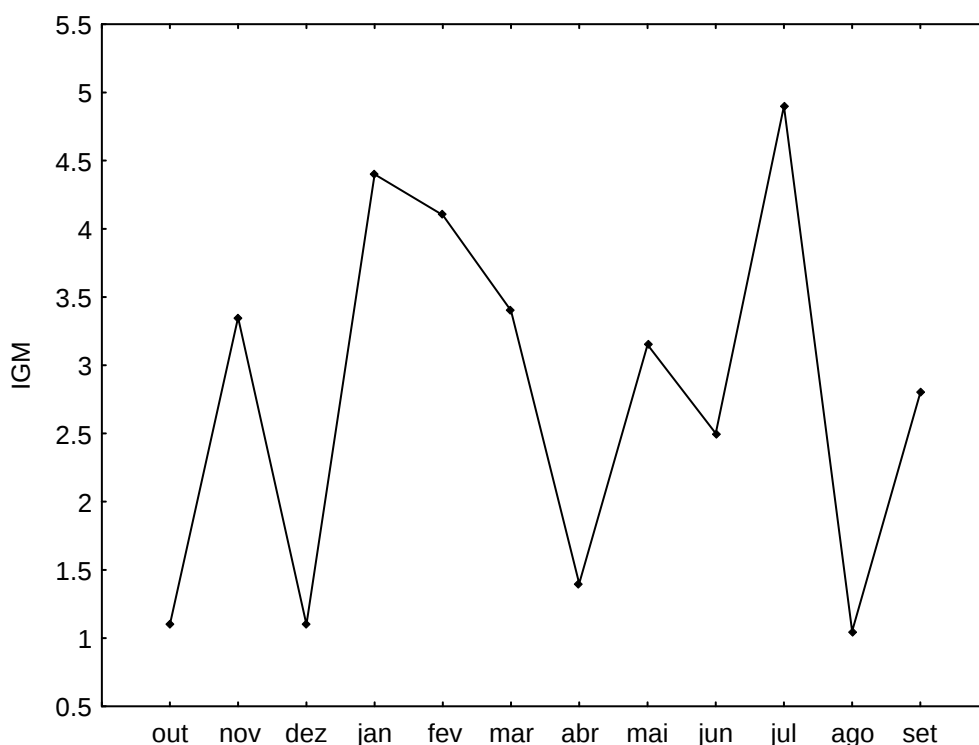


Figura 2.16. Variação do Índice Gonadal Médio (IGM) de *Mytella charruana* coletados na Bacia do Pina, Pernambuco entre os meses de outubro de 2009 e setembro de 2010.

4.5 Intersex em *Mytilopsis leucophaeta*

Durante a análise das gônadas foram observados três indivíduos machos em estado de intersexualidade. Foi identificado *intersex* de nível 1, caracterizado pela presença de um ovócito no folículo masculino (Figura 2.17). Os indivíduos que apresentaram esta característica estavam em estágio de gametogênese inicial, indicando que o fenômeno pode ser resultado de falhas no processo de diferenciação celular (maturação) que caracteriza esse período. *M. leucophaeta* é uma espécie predominantemente gonocórica, portanto a ocorrência deste fenômeno pode estar associada a presença de desreguladores endócrinos no estuário.

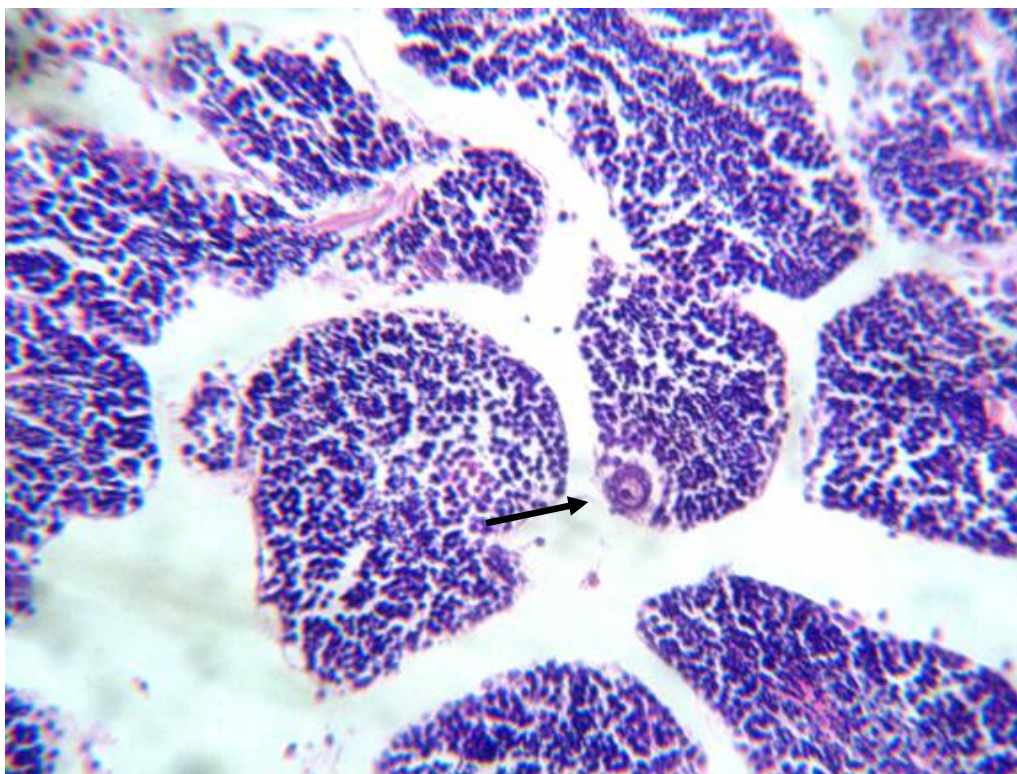


Figura 2.11. Ocorrência de Intersex em macho de *Mytilopsis leucophaeta* coletado na Bacia do Pina, Pernambuco. No detalhe (seta) a presença de ovócito em meio aos gametas masculinos. Aumento 40x.

5.DISSCUSSÃO

Não houve ao longo dos meses diferenças significativas entre a razão sexual para *M. leucophaeta*, entretanto ao longo do ano observou-se maior número de fêmeas em relação ao número de machos, diferindo significativamente da razão 1:1. Os resultados diferem dos observados para outros dreissenídeos como *Dreissena polymorpha* e *Limnoperna fortunei* nas quais a razão sexual registrada é 1:1 (Karatayev et al. 2007). Para *M. charruana* também foi observada prevalência de fêmeas em relação a machos, entretanto não só ao longo do ano, mas em praticamente todos os meses de coleta. Outros estudos também reportaram este padrão para populações desta espécie.. Stenyakina et al. (2010), relataram que a razão sexual em *M. charruana* diferiu significativamente da razão 1:1, chegando em alguns meses de coleta a registrar a razão fêmea/macho de 14,7:1. Christo e Absher (2001) em um estudo sobre o ciclo reprodutivo de *M. charruana* no litoral do Paraná, observaram a ocorrência de 211

fêmeas (59%), 124 machos (34%) e 25 (7%) indivíduos de sexo indeterminado, com uma razão de 1,7 fêmeas para cada macho. Diferentemente de *M. charruana*, Carpes-Paternoster (2003), registrou para *Mytella guyanensis*, uma proporção sexual de 1:1, no manguezal do Rio Tavares em Santa Catarina. Gomes (2009) também não observou diferenças significativas na razão sexual de *M. guyanensis*, no litoral norte do Pará. Cruz e Villalobos (1993), também não observaram diferenças significativas da proporção 1:1 em indivíduos de *M. guyanensis* coletados na Costa Rica, com 50,6% de fêmeas para 49,4% de machos. Newell et al. (1982) ao estudar o ciclo reprodutivo do mitilídeo *Mytilus edulis* em Nova Iorque, Estados Unidos, observou que os machos se apresentaram em maior número que as fêmeas. Mesquita et al. (2001) também observaram maior número de machos em relação a fêmeas no mitilídeo da espécie *Perna perna*, 64 machos para 52 fêmeas. Desta forma, pode se observar que dentro da mesma família, Dressenidae e Mytilidae, as espécies apresentam razões sexuais distintas, indicando que a razão sexual varia a nível populacional.

O ciclo reprodutivo de ambas as espécies demonstrou ser contínuo e assincrônico, com eventos de gametogênese e desova ocorrendo em praticamente todo o ano, sem períodos de repouso sexual. Capes – Paternoster (2003) descreveram um padrão de reprodução similar ao de *M. charruana* para *Mytella guyanensis*, com a gametogênese ocorrendo em praticamente todo o ano, e observou em todos os meses de coleta a presença de indivíduos em desova parcial. Para o mitilídeo *Perna perna* esse padrão reprodutivo também foi descrito, com os indivíduos apresentando atividade reprodutiva durante todo o ano, com picos variáveis ao longo do mesmo (Galvão et al. 2006), como o observado neste estudo.

Verwenn et al. (2005) estudaram a ocorrência de larvas de *M. leucophaeta* no Porto de Antwerp, Bélgica, durante dois anos; os resultados obtidos indicam que o período de desova de *M. leucophaeta* se inicia com as larvas aparecendo no final de maio a junho (início do verão) e dura aproximadamente cinco meses. Em um estudo posterior, no rio Schelde, Bélgica, Verwenn et al. (2009), estudando os estágios gonadais de *M. leucophaeta* encontraram um ciclo reprodutivo anual, com a gametogênese iniciando em janeiro, acelerando através da primavera e início do verão, sendo o período principal de desova de junho a setembro, este último mês apresentou o maior número de indivíduos em estágio de eliminação dos gametas, evidenciando que período de desova durou cerca de seis meses, onde mais de 50% dos indivíduos analisados estavam desovando. Ainda segundo os autores, o período com maior número

de indivíduos em desenvolvimento, ocorreu entre os meses de janeiro a maio. Bamber e Taylor (2002) também descreveram o mesmo período de desova de *M. leucophaeta*, em Noordzeekanal, Amsterdã. Segundo os autores a desova ocorre em temperaturas iguais ou superiores a 20 °C. Wangkulangkul (2009) descreveu os períodos de recrutamento do dreissenídeo *Mytilopsis adamsi* de Novembro a Fevereiro. Segundo os autores, a diminuição da temperatura da água pode favorecer a desova em *M. adamsi*. Covarrubias et al. (2009), que relatou o período de desova de *M. leucophaeta* em Vera Cruz, México, nos meses de baixa temperatura. Ainda neste contexto, Verween et al. (2005) sugerem que a ativação das gônadas nesses animais parece ser acionada pelo declínio da temperatura.

O índice gonadal médio de *M. leucophaeta* apresentou correlação significativa com a temperatura, os resultados são similares aos obtidos por Verween et al. (2009), que encontraram uma forte correlação entre o IGM de *M. leucophaeta* com a temperatura ($r = 0.82$; $p < 0,01$), e correlação não significativa entre o IGM e salinidade ($r = 0.31$; $p = 0.33$). Entretanto, Siddal (1980) relatou que a liberação dos gametas de *M. leucophaeta* ocorre no período chuvoso, quando há diminuição da salinidade. Apesar da salinidade ser um fator importante na regulação do ciclo reprodutivo dos bivalves, tem sido observado que *M. leucophaeta* pode se estabelecer e viver em locais oligohalinos, mesohalinos e em ambientes com água altamente salina, o que permite que essa espécie seja encontrada em quase todo gradiente estuarino (Verween et al. 2010). Apesar de significativa a correlação entre IGM e temperatura foi fraca, indicando que o ciclo reprodutivo dessa população está sendo influenciado por outras variáveis ambientais. Para *M. charruana*, por outro lado, nenhum dos fatores abióticos estudados parecem regular isoladamente o ciclo reprodutivo da espécie no local em estudo. Entretanto não se pode descartar a importância de parâmetros na regulação da reprodução de mitilídeos e de outros bivalves. Neste sentido, Newell et al. (1982) relataram que ciclo reprodutivo dos moluscos bivalves é o resultado de um complexo equilíbrio entre fatores exógenos (salinidade, disponibilidade alimentar, temperatura, luz, fases lunares e marés) e fatores endógenos (reservas alimentares, ciclo hormonal e genótipo). A interação entre estes fatores assegura um sincronismo no desenvolvimento gametogênico e na postura permitindo, assim, que a emissão de gametas ocorra em condições ambientais ótimas para o desenvolvimento larval e embrionário.

Durante o período em estudo foi registrada a ocorrência de parasitas no tecido gonadal de *M. charruana*. Ainda neste sentido, alguns estudos já reportaram a presença

de parasitas em mitilídeos. Henriques (2004), constatou, na baía de Santos, São Paulo, a ocorrência do trematóide digenético *Bucephalus* sp., nas gônadas de *Perna perna*, causando sérios danos às gônadas do mexilhão, por afetar o processo de desenvolvimento gonadal. Também para *P. perna*, Lima (2001), observou em 2,5 % dos animais coletados, a presença do mesmo trematódeo, em Niterói, Rio de Janeiro, tornando impossível a identificação do sexo, já que os animais apresentavam as gônadas altamente infectadas, levando à castração pela destruição do tecido reprodutivo. Ceuta (2010) observou infestação parasitária por *Bucephalus* sp, em *Mytella guyanensis*, na baía de Camamu, Bahia.

A ocorrência de indivíduos de *M. leucopaheta* com intersex indica possivelmente um distúrbio endócrino nesses animais. Substâncias denominadas desreguladores endócrinos (D.E.) são uma categoria recente de poluentes ambientais que interferem nas funções do sistema endócrino. Estes compostos abrangem uma grande faixa de classe de substâncias com estruturas distintas, incluindo hormônios sintéticos e naturais, substâncias naturais e uma grande quantidade de substâncias sintéticas (Bila e Dezotti, 2007).

Alguns autores também reportaram esse fenômeno para bivalves, assim como *M. leucophaeta* predominantemente dióicos. Gomes et al. (2009) observaram a ocorrência de *intersex* em bivalves da espécie *Scrobicularia plana* no rio Guadiana, Portugal. Segundo os autores a presença de D.E. no estuário está fortemente ligada à ocorrência do fenômeno de intersexualidade em espécies gonocóricas como *S. plana*. Chesman e Langston (2006) também descreveram a ocorrência de *intersex* em *S. plana* coletados no estuário Avon, Reino Unido. Os autores sugerem que a espécie pode ser utilizada na investigação sobre a contaminação do ambiente por D.E. Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville (2010) relataram a ocorrência de *intersex* em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* na reserva de Urdaibai situada na Península Ibérica. Os autores atribuíram a ocorrência do fenômeno a presença de D.E no estuário. O estuário do rio Capibaribe recebe vários efluentes industriais e domésticos e abriga em seu curso marinas e o Porto do Recife. Desta forma, esta região recebe diariamente uma descarga de compostos xenobióticos capazes de causar alterações no sistema endócrino dos organismos. A função hormonal que mais vulgarmente é afetada por estes agentes artificiais é o mecanismo de regulação dos esteróides, que maioritariamente determinam as características sexuais e o comportamento das espécies (Nogueira, 2003).

6. CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que a reprodução de *M. leucophaeta* e *M. charruana*, no estuário do rio Capibaribe, é contínua e assincrônica. A temperatura foi um fator importante na regulação do ciclo reprodutivo de *M. leucophaeta*, explicando 34% da variação do IGM. Por outro lado, não houve correlação entre o ciclo reprodutivo de *M. charruana* e a temperatura ou salinidade. Houve um predomínio de fêmeas, na maioria dos meses, para as duas espécies, mas a diferença na razão entre os dois sexos não foi significativa para *M. leucophaeta* e foi significativa para *M. charruana*. Foram observados indivíduos de *M. leucohaeta* com intersex, indicando que a população está sendo afetada por poluentes capazes de causar alterações no sistema endócrino destes bivalves.

Capítulo III

Efeitos do TBT sobre *Mytella charruana* e *Mytilopsis leucophaeta*

1. RESUMO

Os efeitos do tributilestanho (TBT) na espécie nativa *Mytella charruana* e na espécie exótica *Mytilopsis leucophaeta* foram estudados. Animais coletados na Bacia do Pina, Pernambuco, foram transferidos para aquários de 15L, monitorados e alimentados diariamente com microalgas *Chaetoceros* sp. (50.000 células.ml⁻¹). Para avaliar a toxicidade aguda do TBT, indivíduos das duas espécies foram expostos por 96h a concentrações de 2,5, 12,5 e 50µg.L⁻¹ de cloreto de tributilestanho (TBTCI). A toxicidade crônica do TBT sobre *M. leucophaeta* foi avaliada após 14 dias de exposição a concentrações de 1, 5 e 10 µg.L⁻¹ de TBTCI. Nos ensaios de toxicidade aguda observou-se mortalidade de 100% em *M. leucophaeta* expostos a 50 µg L⁻¹, enquanto que para *M. charruana* observou-se 100% de mortalidade na concentração de 12,5 µg L⁻¹ de TBTCI. Após a exposição crônica ao TBT observou-se mortalidade de 73,33% em *M. leucophaeta* na concentração de 10 µg.L⁻¹ de TBTCI. Durante a exposição aguda ao TBT não houve diferenças significativas (p>0,05) na taxa de filtração de *M. charruana* e *M. leucophaeta*, diferentemente do observado para *M. leucophaeta* após 14 dias de exposição, com redução significativa da taxa de filtração (p<0,01) nos indivíduos expostos a 10 µg.L⁻¹ de TBTCI. Em ambos os ensaios, agudo e crônico, a proporção de indivíduos de *M. leucophaeta* com valvas fechadas aumentou de modo significativo com o aumento da concentração de TBTCI (p<0,01). O mesmo foi observado no ensaio de toxicidade aguda sobre *M. charruana*. Os resultados demonstram que a espécie nativa *M. charruana* é mais sensível à exposição ao TBT que a espécie exótica *M. leucophaeta*. Os resultados do teste de toxicidade crônica demonstram que em um maior período de exposição *M. leucophaeta* é capaz de detectar baixas concentrações de TBT na água, e estas resultam em respostas como o fechamento das valvas dos organismos e consequentemente na diminuição da taxa de filtração.

2. INTRODUÇÃO

A toxicidade é a capacidade inerente de uma substância produzir efeitos adversos a um organismo vivo resultante da ação direta do agente tóxico sobre sítios de ação dentro do organismo. É função da concentração, da via de exposição e do tempo de exposição a um determinado agente químico.

A exposição de organismos a agentes químicos pode resultar em efeitos agudos ou crônicos, sendo que os primeiros ocorrem rapidamente e são resultados de um curto período de exposição, enquanto que os crônicos acarretam efeitos deletérios resultantes da exposição a níveis baixos de um contaminante por um longo período de tempo. Neste contexto, os testes de toxicidade com organismos aquáticos foram elaborados para fornecer dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de substâncias químicas sobre organismos aquáticos, e vêm se mostrando muito úteis para orientar decisões de pesquisadores, indústrias e agências ambientais, voltadas para evitar ou minimizar os impactos da poluição hídrica (Valentin; Dezotti, 2008)

Os efeitos agudos são relativamente severos, e o mais comum a ser observado em organismos aquáticos é a letalidade (Rand, 1995). Segundo Aragão e Araújo (2008), o ensaio de toxicidade aguda pode ser definido como aquele que avalia os efeitos em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período de tempo, geralmente de um a quatro dias (24 a 96h).

Os testes de toxicidade crônica são realizados a longo prazo, no quais os organismos são expostos a baixas concentrações dos contaminantes por semanas, meses ou até mesmo anos (Rand et al. 1995). Os testes podem compreender todo o ciclo de vida de um animal ou parte dele. Ensaios com estágios iniciais de desenvolvimento de organismos (embrião, larva, jovem) têm sido utilizados, pois estas fases são mais sensíveis à maioria dos contaminantes, além de requerem menos tempo para sua execução (Aragão e Araújo, 2006), uma vez que se tenha acesso a estes estágios iniciais.

Os bivalves filtradores apresentam grande potencial de bioacumulação de compostos organoestênicos e, servem como bioindicadores da poluição por tributilestano (TBT) nos ecossistemas marinhos por possuírem habilidade limitada para metabolizar e eliminar tal composto (Kannam e Tanabe, 2009). Os efeitos destes compostos sobre esta classe de moluscos são observados principalmente na reprodução, desenvolvimento e sobrevivência dos mesmos em ambientes contaminados (Thain, 1986, Godoi, 2003).

Mytella charruana (Orbigny, 1842) e *Mytilopsis leucophaeta* (Conrad, 1831) são bivalves pertencentes às famílias Mytillidae e Dreissenidae, respectivamente. *M. charruana*, conhecido popularmente como sururu, é encontrado no México, Guiana, Equador, Galapagos, Venezuela, Suriname, Brasil, Uruguai e Argentina, e é amplamente utilizado no nordeste do Brasil para alimentação (Rios, 1985). *M.*

leucophaeta é uma espécie exótica no nordeste brasileiro, conhecida como marisco branco. É natural da América do Norte, sendo encontrado desde Nova Iorque ao México oriental (Abbott et al, 2000). Seu primeiro registro de ocorrência no Brasil foi em uma região estuarina adjacente ao porto do Recife, Pernambuco (Souza et al, 2005). Estas duas espécies de bivalves ocupam intensamente os substratos consolidados da região polihalina do estuário do Rio Capibaribe, onde se situa o Porto do Recife, que também serve de abrigo para inúmeras embarcações de pesca e recreação.

Poucos estudos têm tentado discernir as respostas específicas de espécies nativas e exóticas aos distúrbios causados pelo impacto das ações antrópicas no ambiente (Piola e Johnston, 2009). Entretanto, alguns estudos demonstram que espécies exóticas são mais resistentes a perturbação que espécies nativas (Piola et al. 2009; Dafforn et al. 2008).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do TBT sobre a mortalidade, taxa de filtração e frequência de fechamento das valvas de *M. charruana* e *M. leucophaeta* após 96 h de exposição. E verificar os efeitos do TBT sobre a mortalidade, taxa de filtração, frequência de fechamento das valvas, e desenvolvimento gonadal de *M. leucophaeta* após 14 dias de exposição.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e manutenção dos animais, e preparo das soluções de TBT

Indivíduos das duas espécies foram coletados em dois pontos da região polihalina do estuário da Baía do Pina, Recife, Pernambuco (8°4'46.44''S e 34°53'26.48''O) e (8°4'23.99''S e 34°52'48.02''O). Após coletados, os animais foram acondicionados em sacos plásticos e transferidos para o laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de Pernambuco. A temperatura e salinidade local foram registradas com um termômetro e um refratômetro, respectivamente. Em laboratório, os animais foram transferidos para aquários de 15L, monitorados e alimentados diariamente com *Chaetoceros* sp. (50.000 células.mL⁻¹). A salinidade e temperatura dos aquários foi mantidas em 25 e 25 ± 1°C, respectivamente. Para preparação da solução estoque de TBT, dissolveu-se 0,125g de cloreto de tributilestanho (TBTCl)(Sigma Aldrich, St.Louis, EUA) em 100 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) com volume final aferido num balão volumétrico de 100 mL.

3.2 Ensaio com exposição de 96 horas

Para os ensaios de toxicidade aguda do TBT sobre *M. charruana* e *M. leucophaeta*, foram expostos grupos de 15 indivíduos por 96h para cada um dos cinco tratamentos avaliados, em aquários com 5 L de água do mar. Os tratamentos foram controle, controle de solvente, 2,5, 12,5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TBTCl.

3.3 Ensaio com exposição de 14 dias

Para os ensaios de toxicidade crônica sobre *M. leucophaeta* foram selecionados grupos de 40 indivíduos para cada um dos cinco tratamentos avaliados, em aquários com 10 L de água do mar. Os tratamentos foram controle, controle de solvente, 1, 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TBTCl. No início do experimento dez animais foram selecionados para análise histológica das gônadas. 30 indivíduos foram expostos aos tratamentos acima por 14 dias, sendo que 10 foram retirados ao final da exposição para análise histológica. Durante os experimentos a salinidade e a temperatura foram mantidas em 25 e $25 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente. Os indivíduos foram alimentados diariamente com microalgas *Chaetoceros* sp. (50.000 células. mL^{-1}), com troca diária da 100% da água.

3.4 Taxa de filtração

Nos ensaios de toxicidade aguda (96 horas) a taxa de filtração foi avaliada adicionando-se células de *Chaetoceros* sp. aos aquários de cada tratamento com 15 indivíduos. Após a inclusão das microalgas a contagem de células foi feita diariamente com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, em dois momentos: 1h e 24h após o fornecimento das algas.

No ensaio de toxicidade crônica (14 dias) a taxa de filtração de *M. leucophaeta* foi avaliada ao final do experimento. Para tal, quatro indivíduos de cada tratamento foram avaliados de forma isolada em aquários de 400 mL contendo solução de água do mar e células de *Chaetoceros* sp a uma concentração aproximada de 100.000 células. mL^{-1} . (Figura 3.1). A contagem de células foi feita 1h após a introdução dos animais nos aquários.

3.5 Frequência de fechamento de valvas

O número de indivíduos de *M. charruana* e *M. leucophaeta* com valvas fechadas foi quantificado durante os ensaios de toxicidade aguda de hora em hora entre 48 e 52h, e entre 72 e 76h após o início da exposição. A frequência de fechamento foi calculada dividindo-se o número de indivíduos com valvas fechadas pelo total de indivíduos vivos presentes em cada tratamento.

Durante o ensaio de toxicidade crônica (14 dias) com *M. leucophaeta* o número de indivíduos com valvas fechadas foi monitorado após 2, 5 e 8 dias do início da exposição.

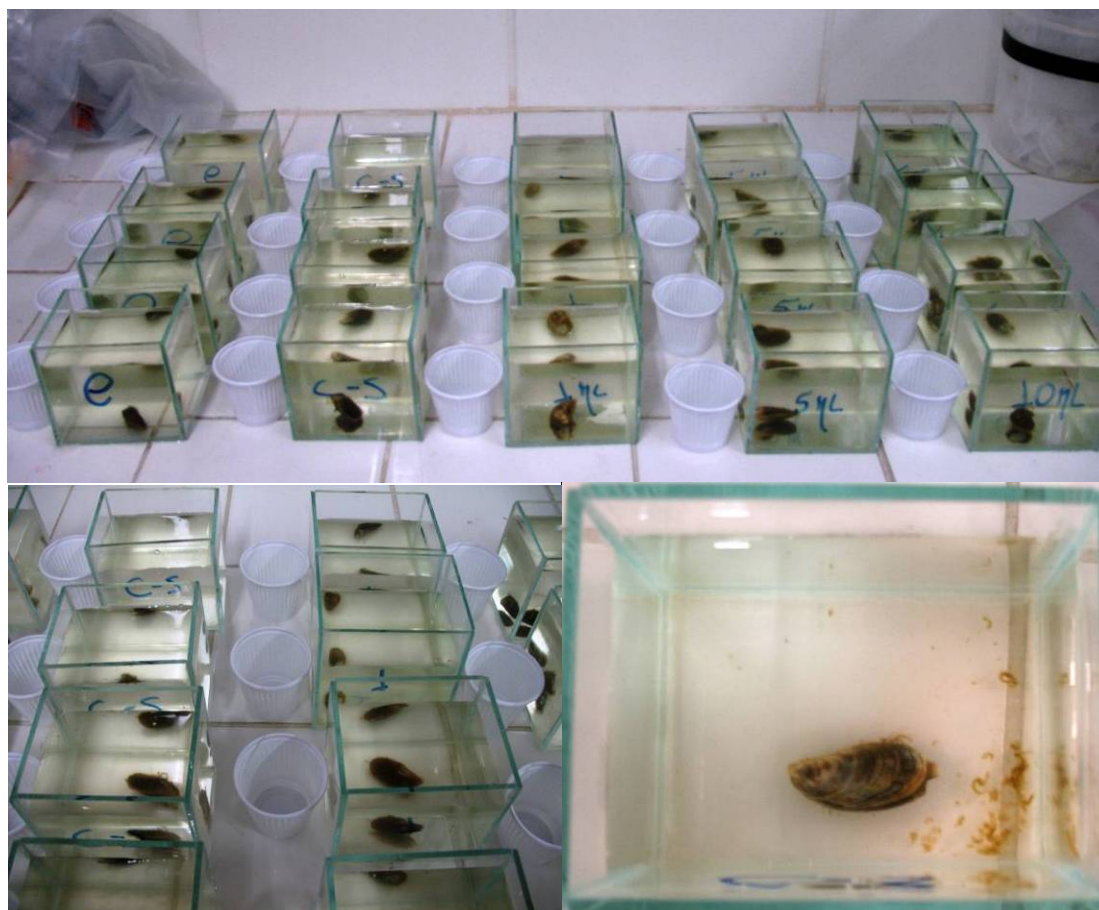


Figura 3.1. Monitoramento da taxa de filtração em *Mytilopsis leucophaeta* após 14 dias de exposição ao TBTCI. Detalhe de um aquário na parte inferior direita.

3.6 Histologia gonadal

Para avaliar os efeitos crônicos do TBT sobre o desenvolvimento gonadal de *M. leucophaeta* foram retirados 10 indivíduos no início e 10 ao final do experimento para a

determinação dos estágios gonadais através da análise histológica das gônadas. Os animais tiveram as partes moles removidas e fixadas em formol salino 10%. Após a fixação, os animais foram conservados em álcool 70%. O material biológico foi processado histologicamente, sendo desidratado em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e impregnados em parafina (54-56°C). Depois de impregnados, os blocos foram incluídos em parafina (56-58°C). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 5 µm de espessura com auxílio de micrótomo e navalha de aço. Posteriormente os cortes foram submetidos à coloração com hematoxilina de Harris e eosina (HE). Os cortes dos blocos e a rotina de coloração foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Ultra-estrutura do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães.

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram avaliados para presença de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homoscedasticidade pelo teste de medianas de Levene. Foi utilizada análise de variância para avaliar diferenças nos parâmetros entre os diferentes tratamentos, seguida do teste de comparação múltipla de Dunnett para avaliar diferenças entre o controle e os outros tratamentos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado quando não foi verificada a normalidade ou homocedasticidade dos dados. As análises foram realizadas através do programa STATISTICA ® versão 6.0. A análise da concentração letal a 50% dos organismos (CL50) foi calculada com o programa Trimmed Spearman Karber versão 1.5 (United States Environmental Protection Agency, 2011).

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio com exposição de 96 horas

4.1.1 Mortalidade

Os indivíduos de *M. leucophaeta* apresentaram mortalidade de 0% nos controles e 12,5 µg L⁻¹, atingindo 33% na concentração de 12,5 µg L⁻¹, e 100% na concentração de 50 µg L⁻¹ de TBTCI após 96 h de exposição. (Figura 3.2). A CL50 96h calculada para *M. leucophaeta* foi igual a 15,17 µg L⁻¹, com limites de confiança de 95% inferior de

10,54 $\mu\text{g L}^{-1}$ e superior de 21,85 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para *M. charruana* observou-se mortalidade de 13,33% dos indivíduos do grupo controle, 10% no controle de solvente e 13,33% em 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, atingindo 80% para os tratamentos com 12,5 e 100% no tratamento 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TBTCI após 96h de exposição (Figura 3.2). A CL50 96h para *M. charruana* calculada foi igual a 7,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, com limites de confiança de 95% inferior de 5,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e superior de 10,9 $\mu\text{g L}^{-1}$.

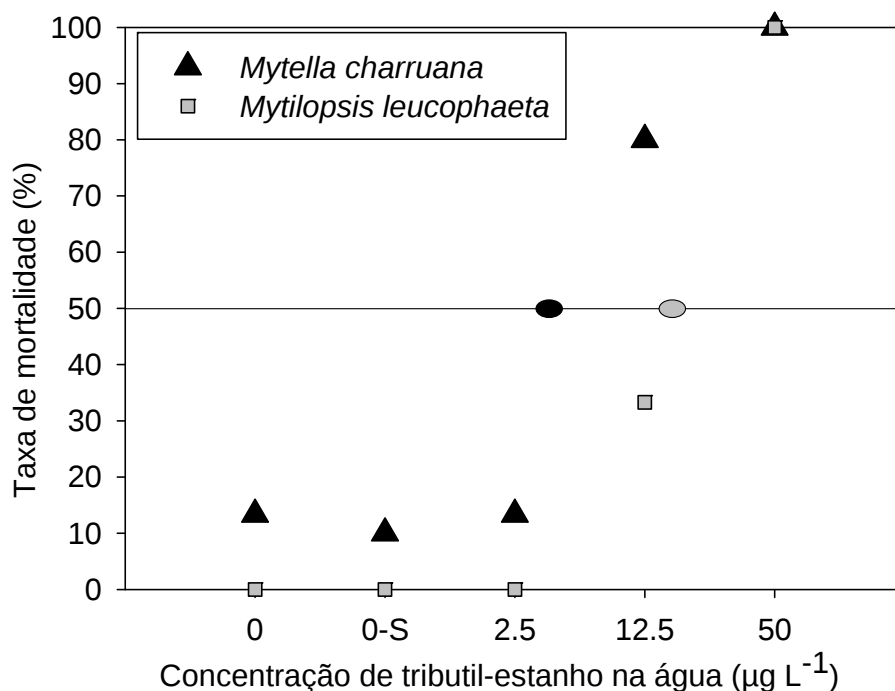


Figura 3.2. Taxa de mortalidade de *Mytella charruana* e *Mytilopsis leucophaeta* após 96h de exposição ao TBTCI. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = controle de solvente). Elipses indicam CL50 calculada pelo método de Spearman-Kärber.

4.1.2 Taxa de Filtração

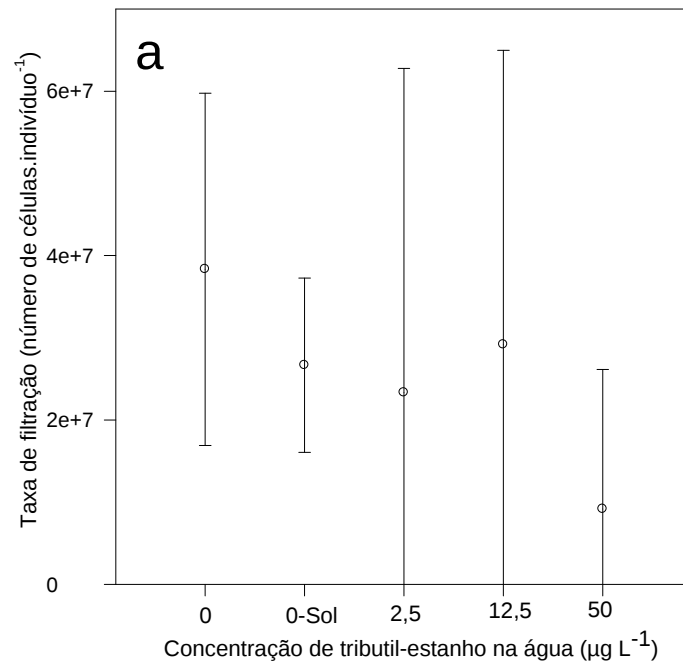
A taxa de filtração de *M. leucophaeta* decorrida uma hora após a adição das algas foi em média 38×10^6 no controle, 26×10^6 no controle de solvente, 23×10^6 no tratamento com 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 28×10^6 no tratamento com 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 9×10^6 no tratamento com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.3a). Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Anova, $F_{4,19} = 1,54$, $p = 0,24$).

A taxa de filtração de *M. leucophaeta* decorridas 24 horas após a adição das algas foi em média 75×10^6 no controle, 79×10^6 no controle de solvente, 72×10^6 no

tratamento com $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, 80×10^6 no tratamento com $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e 40×10^6 no tratamento com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.3b). Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Anova, $F_{4,19} = 2,78$, $p = 0,065$).

Para *M. charruana* a taxa de filtração decorrida uma hora após a adição das algas foi em média 53×10^6 no controle, 50×10^6 no controle de solvente, 47×10^6 no tratamento com $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, 51×10^6 no tratamento com $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e 38×10^6 no tratamento com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.4a),

Em 24 horas, a taxa de filtração de *M. charruana* foi em média 61×10^6 no controle, 24×10^7 no controle de solvente, 62×10^6 no tratamento com $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, 60×10^6 no tratamento com $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e 37×10^6 no tratamento com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3.4b). Apesar de o consumo ter sido, em média, menor no tratamento com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ TBTCI, as diferenças encontradas não foram significativas, tanto para o período de uma hora ($F_{(4, 14)}=0,76$, $p>0,57$), quanto para o de 24 horas entre todos os grupos, incluindo controles e tratamentos ($F_{(4, 14)}=0,99623$, $p>0,44$).



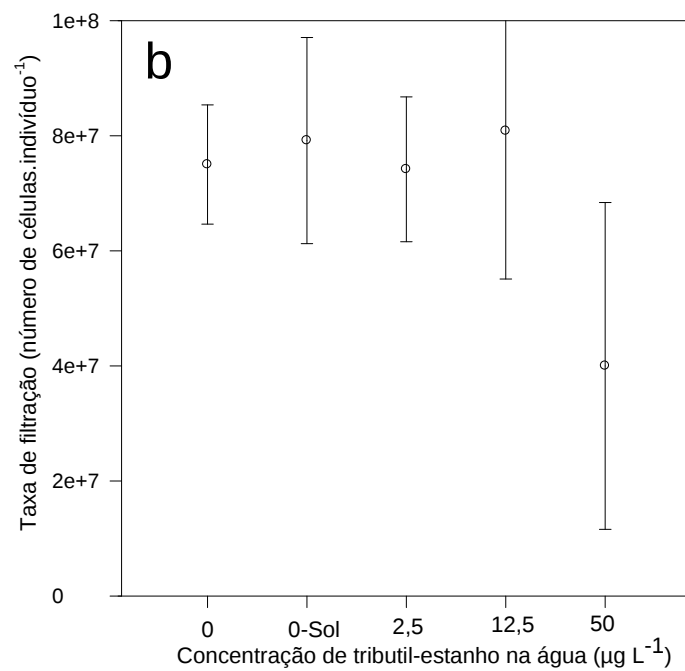
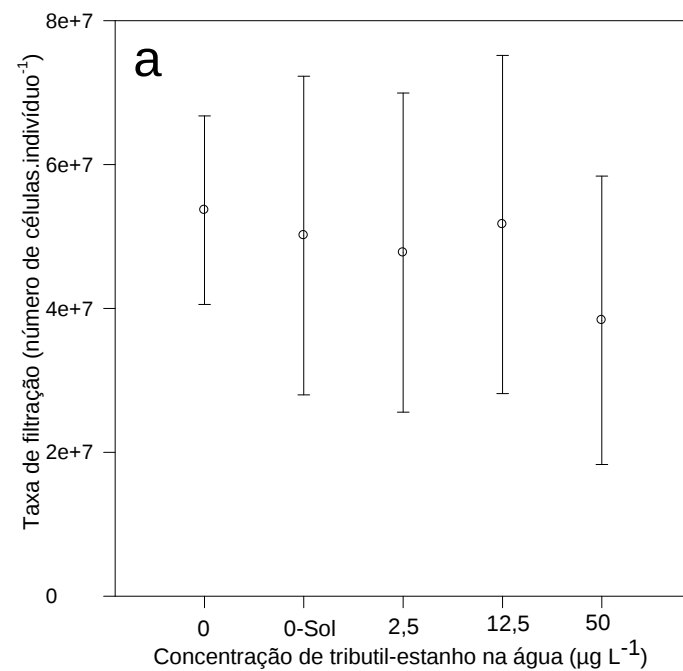


Figura 3.3. Taxa média de filtração de células de microalgas por *Mytilopsis leucophaeta* submetido a diferentes concentrações de TBTCI, **(a)** após uma hora e **(b)** após 24 horas da introdução das microalgas. Barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente).



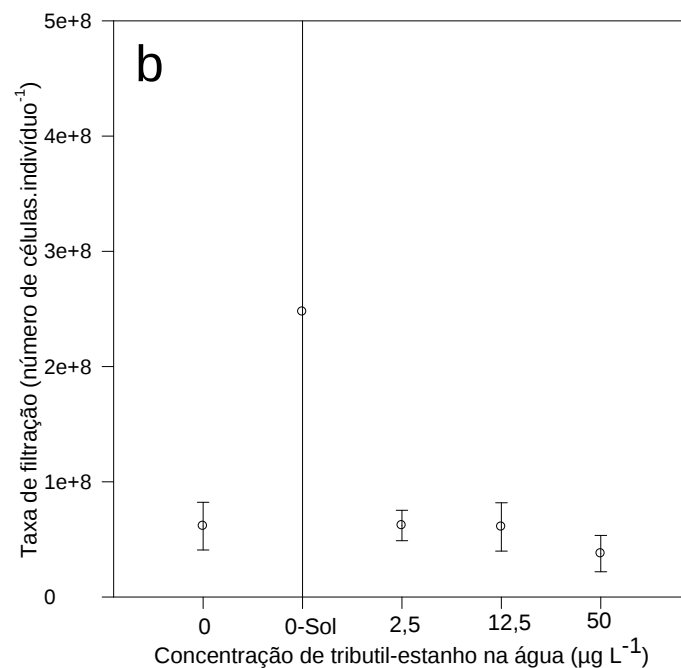


Figura 3.4. Taxa média de filtração de células de microalgas por *Mytella charruana* em diferentes concentrações de TBTCI após uma hora **(a)** e após 24 horas **(b)** da introdução das microalgas.. Barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente).

4.1.3 Frequência de fechamento de valvas

A frequência de indivíduos de *M. leucophaeta* com valvas fechadas aumentou de modo significativo com o aumento da concentração de TBTCI ($F_{(4, 45)}=44,8$, $p<0,01$). A frequência de valvas fechadas foi igual a 18,7% no controle, 10% no controle/solvente, 20,7%, 34,7% e 84,7% nas concentrações de 2,5, 12,5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 3.5). A frequência de valvas fechadas nas concentrações de 12,5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram significativamente maiores que no controle (Anova $F_{4,45} = 57,4$, $p<0,001$, seguido de Dunnett, $p < 0,05$).

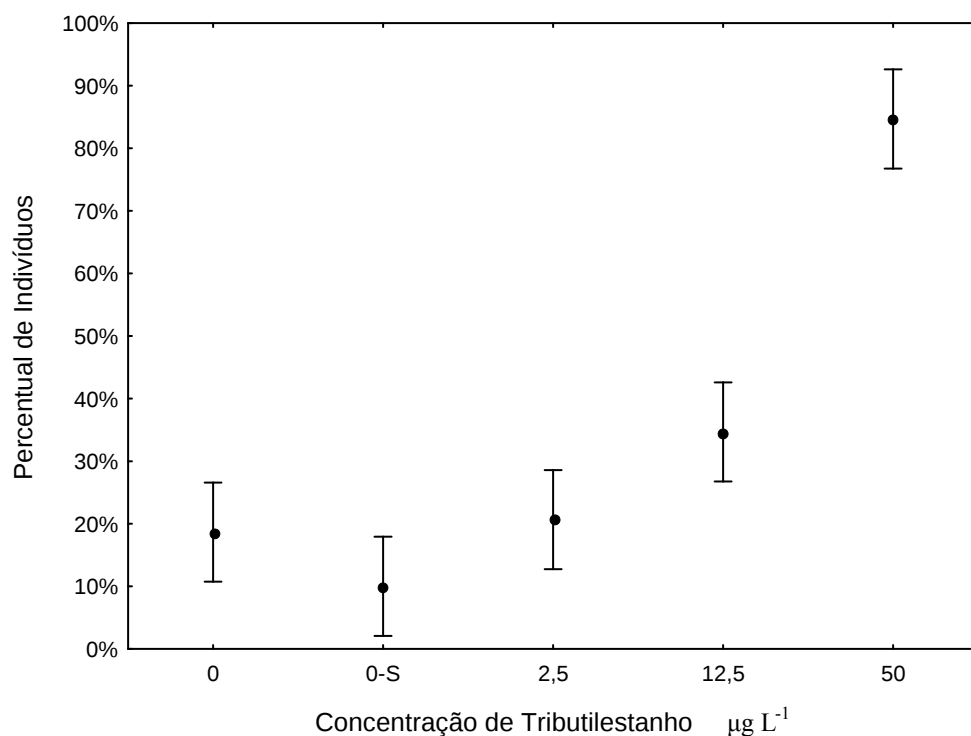


Figura 3.5. Percentual médio de indivíduos de *Mytilopsis leucophaeta* com valvas fechadas entre 48h e 76h após o início da exposição. A barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente).

Para *M. charruana* também foi observado um aumento no número de indivíduos com valvas fechadas, que foi de 10 % e 12,8% nos controles, e de 21,5%, 47,7% e 86,7% nas concentrações de 2,5, 12,5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Anova $F_{4,44} = 13,9$, $p < 0,001$, seguido de Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 3.6).

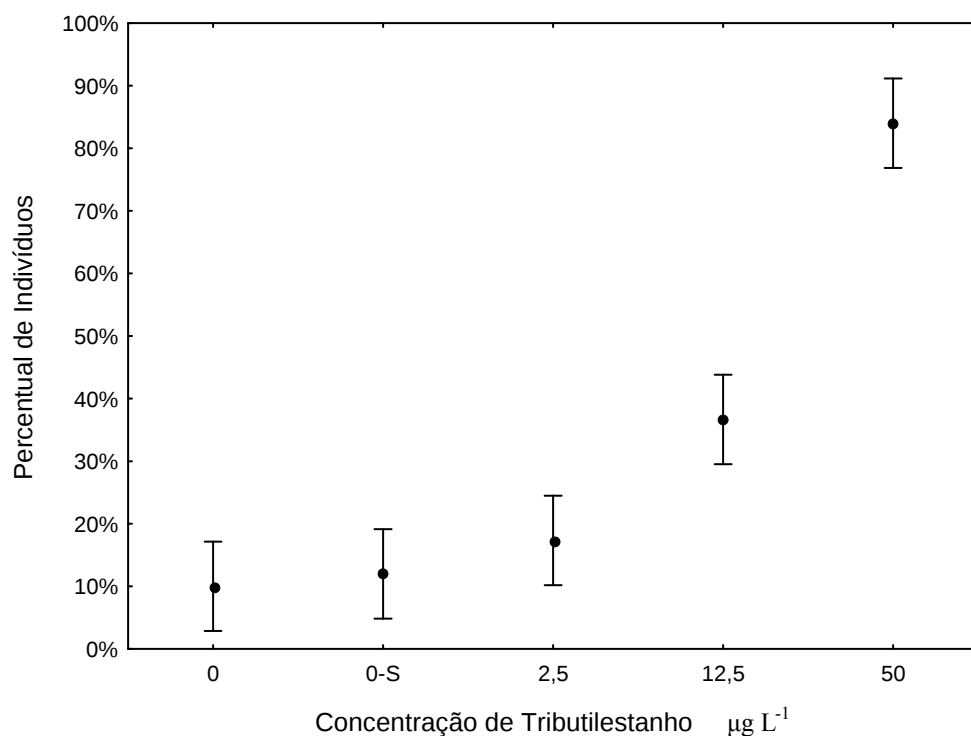


Figura 3.6. Percentual médio de indivíduos de *Mytella charruana* com valvas fechadas entre 48h e 76h após o início da exposição. A barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=15 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente).

4.2 Ensaios com exposição de 14 dias

4.2.3 Mortalidade

Os indivíduos de *M. leucophaeta* apresentaram mortalidade de 3,3% no controle, e 12,5 µg L⁻¹, 0% para o controle-solvente e 1 µg L⁻¹, 16,66% no tratamento com 5 µg L⁻¹ e 73,33% no tratamento com 10 µg L⁻¹ de TBTCI (Figura 3.7). A CL50 14 dias calculada para *M. leucophaeta* foi igual a 7,59 µg L⁻¹, com limites de confiança de 95% inferior de 6,65 µg L⁻¹, e superior de 8,68 µg L⁻¹.

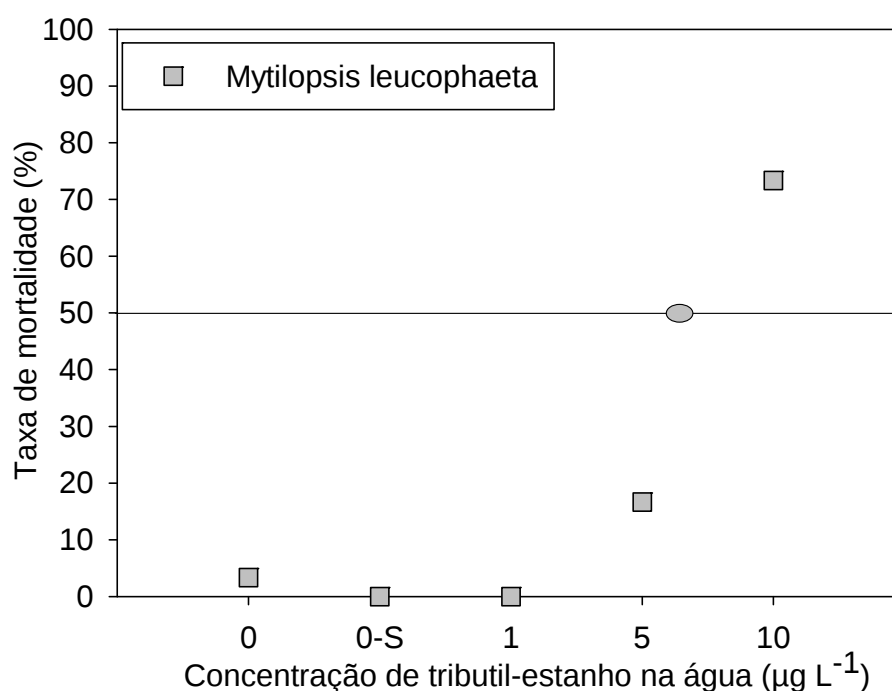


Figura 3.7. Taxa de mortalidade de *Mytilopsis leucophaeta* após 14 dias de exposição ao TBTCI. n=30 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle de solvente). Elipse indica CL50 calculada pelo método de Spearman-Kärber.

4.2.4 Frequência de fechamento de valvas

A frequência de indivíduos de *M. leucophaeta* com valvas fechadas aumentou de modo significativo com o aumento da concentração de TBTCI. A frequência de valvas fechadas foi igual a 19,9% no controle, 29,3% no controle de solvente, passando a 40,0%, 56,8% e 79,2% nas concentrações de 1, 5 e 10 µg L⁻¹, respectivamente (Figura 3.8), sendo a frequência nas concentrações de 5 e 10 µg L⁻¹ significativamente maiores que no controle (F4,14=12,1, p < 0,001, Dunnet, p < 0,05).

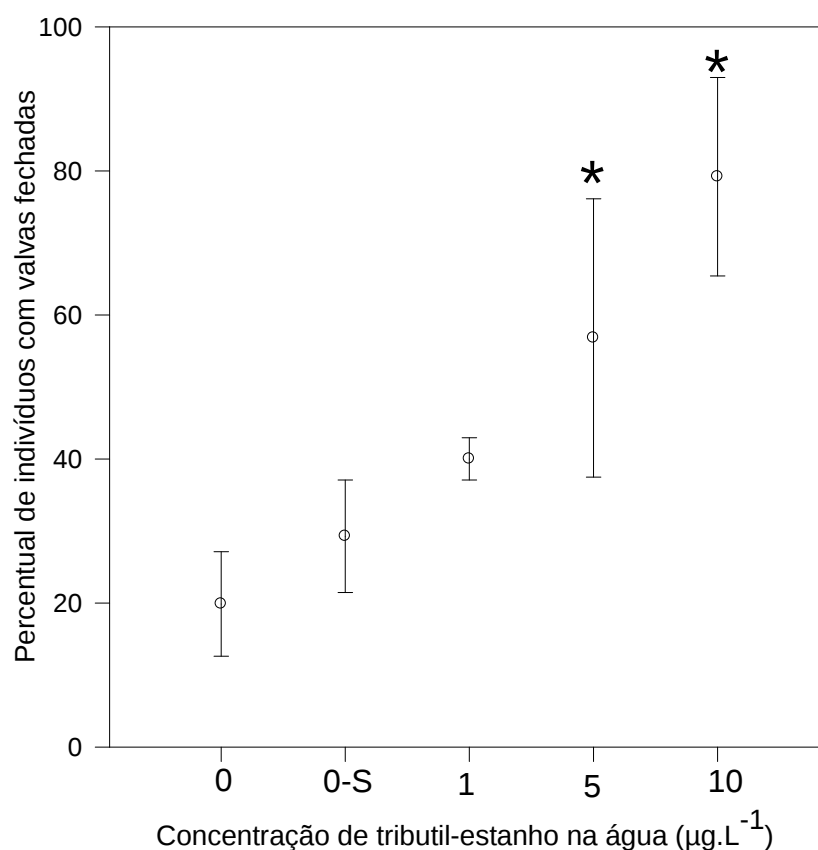


Figura 3.8. Percentual médio de indivíduos de *Mytilopsis leucophaeta* com valvas fechadas durante o experimento. A barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=30 indivíduos por tratamento. (*: diferente do controle, 0-S = Controle de solvente).

4.2.3 Taxa de Filtração

Foi observado um decréscimo da taxa de filtração de *M. leucophaeta* com o aumento das concentrações de exposição ao TBTCI. A taxa de filtração de *M. leucophaeta* foi de $1,6 \times 10^8$ células.L⁻¹ no controle, $1,8 \times 10^8$ células.L⁻¹ no controle de solvente, caindo para $5,7$, $3,5$ e $2,9 \times 10^7$ células.L⁻¹ nas concentrações de 1, 5 e 10 µg L⁻¹, todas estatisticamente diferentes do controle ($F_{4,19}=57,3$ $p<0,001$, Dunnett, $p<0,05$) (Figura 3.9).

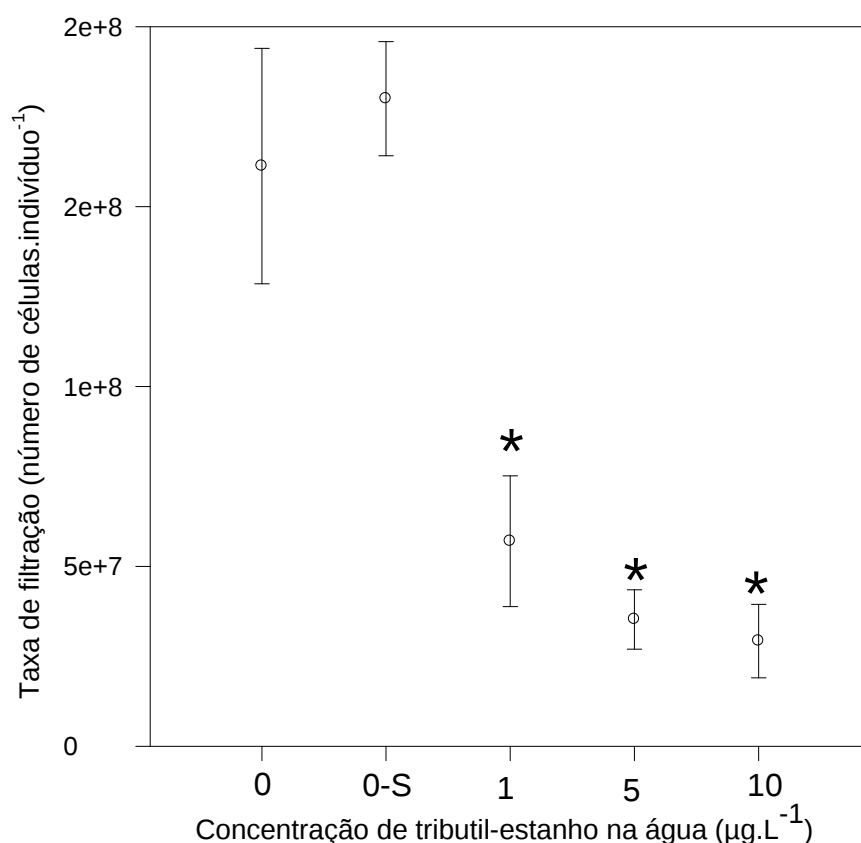


Figura 3.9. Taxa de Filtração de *Mytilopsis leucophaeta* durante uma hora. Barra vertical indica 95% do intervalo de confiança. n=30 indivíduos por tratamento. (0-S = Controle/solvente).

4.2.4 Histologia Gonadal

Não se observou anormalidades nas gônadas através da análise histológica. Foram caracterizados estágios de gametogênese, maturação, desova parcial, desova total e repouso sexual ou indiferenciado. No início do experimento em média 68% dos indivíduos estavam em desova, 6% estavam maduros e 33% estavam em gametogênese. Ao final do experimento apenas indivíduos do controle e controle solvente apresentaram atividade de proliferação de gametas, com uma média de 50% dos indivíduos analisados em gametogênese (Figura 3.10). No tratamento com 1 µg L⁻¹ 50% dos indivíduos estavam maduros, 20% em desova e 30% em repouso. Já no tratamento com 5 µg L⁻¹ metade dos indivíduos estavam em estágio de repouso sexual, não sendo possível a identificação do sexo (Figura 3.11), e metade em desova. No tratamento com 50 µg L⁻¹ 100% dos indivíduos sobreviventes estavam em desova (Figura 3.12).

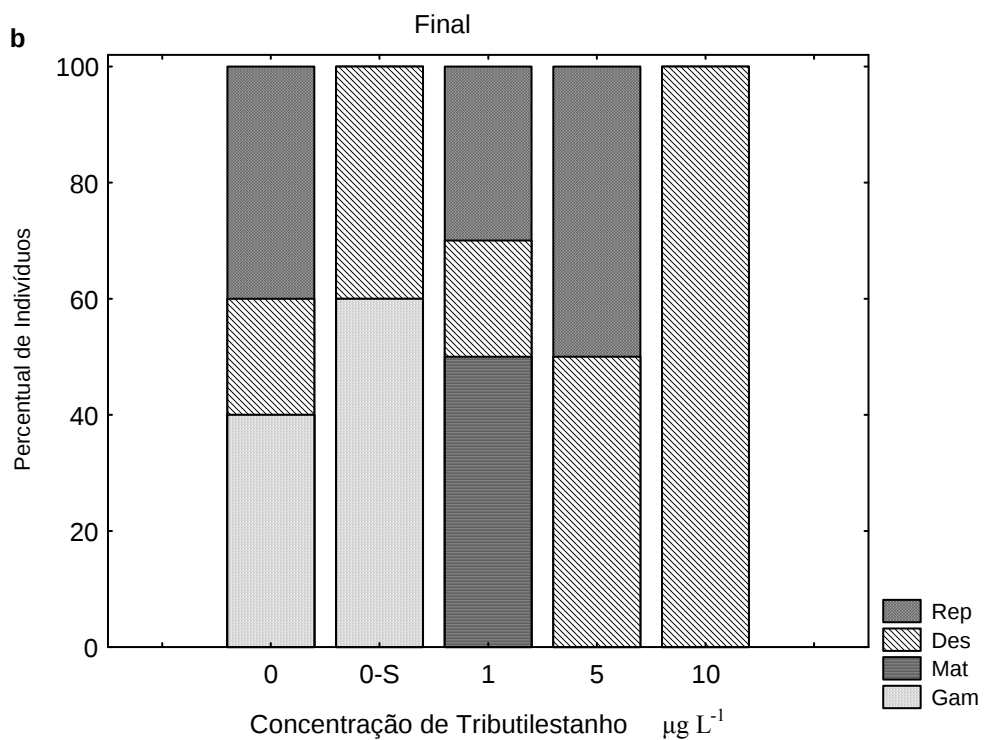


Figura 3.10. Estágios de desenvolvimentos gonadal de *Mytilopsis leucophaeta* no final do experimento. Rep=repouso; Gam=gametogênese; Mat=maturação e Des=desova. (0-S = Controle de solvente).

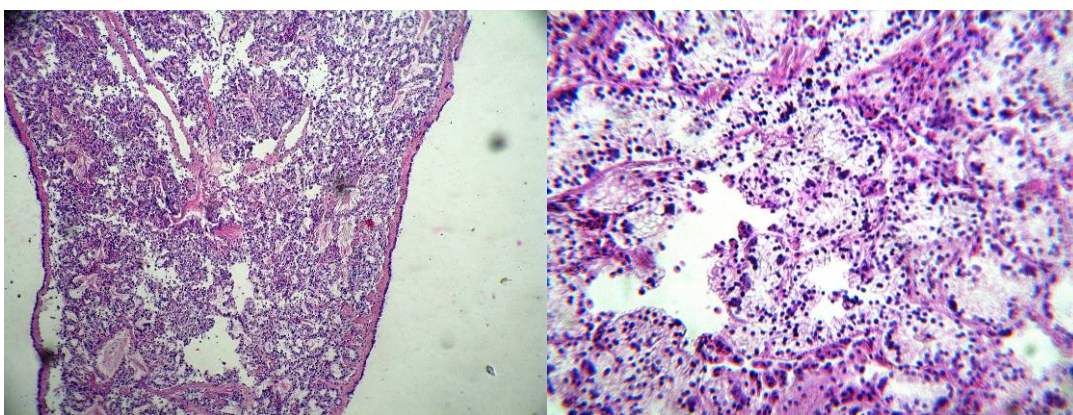


Figura 3.11. Indivíduo de *Mytilopsis leucophaeta* em estágio de indiferenciação sexual (repouso). Aumento de 10x à esquerda e 40x à direita.

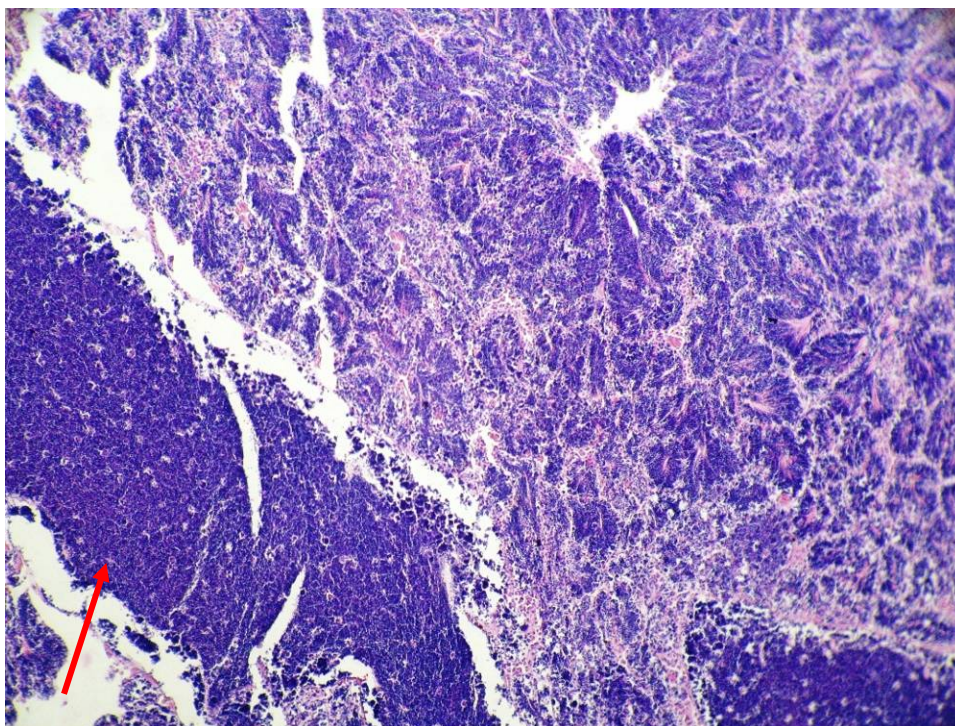


Figura 3.12. Macho de *Mytilopsis leucophaeta* após 14 dias de exposição a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de TBTCI em desova parcial. No detalhe (seta) observa-se estrutura com grande quantidade de gametas masculinos. Aumento de 10x.

5. DISCUSSÃO

5.1 Mortalidade

Os resultados dos testes de toxicidade com TBTCI indicam que *Mytella charruana* é significativamente sensível ao tributilestanho, quando comparada com o marisco branco *M. leucophaeta* e com outros bivalves. A CL50 96h para *M. charruana* foi igual a $7,9 \mu\text{g L}^{-1}$, menor que a CL50 96h para *M. leucophaeta* obtida neste trabalho de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, e também menor que as CL50 96h ao óxido de tributil-estanho (TBTO) para o mexilhão *M. edulis* de $35 \mu\text{g L}^{-1}$ (Salazar e Salazar, 1989), e de $38 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Thain, 1983 *apud* Héral et al., 1989). *M. charruana* também se mostrou mais sensível ao TBT que o bivalve *Lamellidens marginalis* com CL50 96h igual a $1,72 \text{ mg.L}^{-1}$ (Jagtap e Shejule, 2010), e que os bivalves da espécie *Villorita cyprenoides*, com CL50 96h (TBTO) igual $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (Sujatha et al. 1996). Por outro lado, *Mytella charruana* mostrou-se mais resistente que *Ostrea edulis*, que apresentou mortalidade de 20% quando exposta a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ após 96h (Axiak e Sammut, 1995).

A maior resistência de espécies exóticas, como *M. leucophaeta*, em relação a espécies nativas, como *M. charruana* já foi observada em outros estudos com diferentes espécies (Piola et al. 2009; Dafforn et al. 2008; Piola e Johnston 2009). Ruiz et al. (1999) sugerem que as interações entre espécies exóticas ou não-nativas com estressores antropogênicos, podem garantir as primeiras maior sucesso na colonização e estabelecimento no ambiente. Estudos têm demonstrado que ambientes degradados pela ação antrópica são mais suscetíveis a invasão de espécies exóticas. Entretanto, poucos trabalhos têm avaliado a diferença entre as respostas de espécies nativas e invasoras à perturbação, e estudos sobre as interações entre as espécies exóticas e os distúrbios causados pela ação do homem, são praticamente inexistentes. (Piola e Johnston, 1999, Ruiz et al. 1999).

Piola et al. (2009) relataram que indivíduos introduzidos no ambiente através da incrustação nos cascos de embarcações protegidas com tintas a base de Cobre, adquirem maior resistência ao contaminante e apresentam vantagem competitiva em relação as espécies nativas de um ambiente poluído por este metal. Dafforn et al. (2008) através de 10 meses de monitoramento, compararam o recrutamento de espécies nativas e exóticas em placas pintadas com tintas anti-incrustantes a base de Cu e TBT. A presença do Cu reduziu o recrutamento das espécies nativas e aumentou significativamente o recrutamento das espécies exóticas, quando comparados com o controle. Ainda segundo os autores, o recrutamento de ambos os grupos (exóticos e nativos) foi reduzido nas placas pintadas com tinta a base TBT. Os mesmos sugerem que o uso de tintas anti-incrustantes a base de cobre em embarcações pode estar facilitando o transporte e estabelecimento de espécies exóticas tolerantes ao cobre em ambientes antropizados.

Piola e Johnston (2009) observaram que espécies nativas de briozoários tiveram mortalidade superior quando comparadas a espécies exóticas expostas ao Cu. Os autores constataram ainda que colônias das espécies nativas expostas a 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu tiveram a eficiência alimentar reduzida quando comparados ao controle. Em contrapartida as colônias de espécies exóticas mostraram alta eficiência alimentar quando expostos as mesmas concentrações de Cu pelo mesmo período de tempo. Os resultados deste estudo são semelhantes aos obtidos nos estudos acima, nos quais a espécie exótica *M. leucophaeta* se mostrou mais resistente ao TBT que a espécie nativa *M. charruana*.

5.2 Taxa de filtração

A taxa de filtração é uma medida da capacidade de remoção de partículas (alimento) pelo organismo filtrador, sendo que quanto maior o valor para a taxa de filtração, maior é a capacidade do organismo em retirar aquele item alimentar do ambiente (Rückert et al, 2004). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre controles e tratamentos nos testes de toxicidade aguda, este é um parâmetro amplamente utilizado no monitoramento da contaminação por outros poluentes. Indivíduos de *Dreissena polymorpha* expostos ao cobre (Cu), zinco (Zn) e cádmio (Cd) apresentaram forte sensibilidade a estes contaminantes e em altas concentrações quase todos os animais fecharam as valvas e a taxa de filtração caiu para próximo de zero (Kraak et al. 1994). Kádár et al. (2001) submeteram bivalves da espécie *Anodonta cygnea* a concentrações crescentes de Alumínio (Al) e observaram que em $500 \mu\text{g L}^{-1}$ os indivíduos tiveram a taxa de filtração reduzida e a porcentagem de indivíduos com valvas abertas caiu cerca de 50%.

Chusheng et al. (1993) expuseram mexilhões *Perna viridis* por 96h a diferentes contaminantes, cádmio, cobre, mercúrio e fração solúvel de óleo diesel, e observaram que a concentração efetiva que levava ao fechamento das valvas de 50% dos organismos (CE50) foi de 1,25; 0,10; 0,002 e 20,40 mg L^{-1} , respectivamente, com redução na taxa de filtração entre 59 a 81%. Ainda segundo os autores, a taxa de filtração pode ser usada como ferramenta para o monitoramento da poluição, por ser um método simples e rápido, não requerer equipamentos caros, e por se obter respostas em um período relativamente curto, pelo fato de que mexilhões são amplamente distribuídos geograficamente e de fácil coleta e manutenção em laboratório. Os autores ressaltam ainda que o monitoramento de respostas fisiológicas demonstra ser mais eficiente do que o da letalidade, tendo em vista por exemplo que a capacidade alimentar de um indivíduo influencia também o crescimento e desenvolvimento do mesmo, e tem consequências importantes para a população.

Diferentemente do que foi observado nos ensaios de toxicidade aguda, indivíduos de *M. leucophaeta* expostos às concentrações subletais de 1, 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ TBTCI apresentaram diminuição significativa na taxa de filtração em relação aos controles após um período de 14 dias de exposição. Outros estudos têm demonstrado que em um maior período de tempo, os organismos são capazes de detectar concentrações menores dos contaminantes. Neste contexto, Kraak et al (1992)

detectaram uma redução drástica na taxa de filtração de *Dreissena polymorpha* quando exposta por dez semanas a concentrações de $9 \mu\text{g L}^{-1}$ de cádmio. Sze e Lee (2000) observaram diminuição na atividade alimentar em *Perna viridis* após exposição crônica a concentrações de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre, quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Os autores utilizaram a taxa de clareamento e a taxa de ingestão para avaliar a taxa de filtração dos indivíduos após 30 dias de exposição. O mesmo padrão foi observado para a taxa de ingestão, que diminuiu de 82×10^6 para $66.8 \times 10^6 \text{ Cel.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nos tratamentos, e aumentou de 82×10^6 para $85.4 \times 10^6 \text{ Cél.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no grupo controle.

5.3 Frequência de fechamento de valvas

Variações na movimentação das valvas dos bivalves também têm sido cada vez mais utilizadas como parâmetro para avaliar a contaminação do ambiente. Neste estudo a concentração de efeito observado (CEO) para frequência de indivíduos com valvas fechadas foi igual a $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ TBT para ambas as espécies testadas após 96h de exposição, sendo que a CEO foi igual a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ TBT para *Mytilopsis leucophaeta* expostos por 14 dias. Diversos estudos têm demonstrado que o comportamento de abertura e fechamento das valvas é alterado em determinadas situações de estresse, inclusive durante a exposição a contaminantes (Gregory et al, 2002; Liao et al, 2009, Liao et al, 2005, Markich et al., 2000; Rajagopal et al. 2003; Sobrino-Figueroa e Cáceres-Martínez, 2009). Flutuações na abertura e fechamento das valvas de mexilhões podem indicar o aumento de poluentes no ambiente que, somada ao monitoramento da atividade de filtração desses animais, pode ser usada como uma ferramenta útil e eficaz no biomonitoramento ambiental (Englund e Heino, 1994).

Os resultados deste estudo sugerem que em concentrações relativamente pequenas entre $12,5$ e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ TBT, indivíduos de ambas as espécies tendem a encerrar suas valvas e conseqüentemente diminuir sua atividade alimentar. Estes resultados corroboram com os de outros estudos realizados com outras espécies de bivalves, os quais demonstram que à medida que as concentrações de contaminantes aumentam, a porcentagem de abertura das valvas diminui, reduzindo, portanto a taxa de filtração. Mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos a diferentes concentrações de mercúrio (Hg), cobre (Cu), zinco (Zn) e cádmio (Cd), apresentaram uma diminuição no tempo de abertura das valvas, resultando na adução reforçada das valvas, e por fim, no encerramento das mesmas (Ait Fdil et al, 2006).

Ham e Peterson (1994) observaram o comportamento de abertura e fechamento das valvas em *C. fluminea* durante 18 dias, expostas a concentrações de cloro entre 0,02 e 0,07 mg L⁻¹. Os autores registraram diferenças significativas no número de indivíduos com valvas fechadas entre controle e tratamentos. Curtis et al. (2000) expuseram mitilídeos *Mytilus edulis* ao cobre por dez dias, e observaram que a porcentagem de indivíduos com valvas abertas diminuiu a medida que o tempo de exposição e as concentrações de cobre aumentavam, de 0 a 12,5 µM de CuCl₂.

Os resultados observados no teste de toxicidade crônica do TBT sobre *M. leucophaeta* sugerem que em um maior período de exposição ao TBT, organismos desta espécie apresentam respostas negativas a contaminação em baixas concentrações. Os organismos expostos a concentração de 1 µg L⁻¹, possivelmente encontrada no ambiente, diminuem a atividade alimentar em consequência do fechamento das valvas.

5.4 Histologia gonadal

Informações sobre a influência do TBT sobre o desenvolvimento gonadal em bivalves são raras na literatura. Através da análise histológica do tecido gonadal dos indivíduos de *M. leucophaeta* expostos ao TBTCI, foi observado que apenas os indivíduos do controle e controle de solvente apresentaram atividades de proliferação de gametas (gametogênese) ao final da exposição. De modo semelhante ao observado neste estudo, Thain (1986) registrou uma diminuição no índice gonadal médio em indivíduos da espécie *Ostrea edulis* expostos ao Tributilestanho por 75 dias, indicando um retardamento na maturação gonadal. Neste estudo, apesar de que a maioria dos indivíduos de *M. leucophaeta* estavam em desova no início do experimento, ao final da exposição o número de indivíduos em desova diminuiu no controle e controle solvente e permaneceu elevado nos tratamentos com 5 e 10 µg L⁻¹ de TBTCI, supondo um retardo no processo de desova após a exposição ao TBTCI (Figura 3.10).

Os efeitos da exposição crônica ao TBT são bem conhecidos para Gastrópodes. Ele atua como desregulador endócrino promovendo a masculinização de fêmeas, fenômeno conhecido com imposex. Cerca de 120 espécies de moluscos gastrópodes exibem o fenômeno quando expostas a contaminação por compostos orgânicos de estanho tais como o Tributilestanho (TBT) e o Trifenilestanho (TPT) (Castro et al. 2008). O TBT atua nestes organismos inibindo a atividade do citocromo P450 aromatase, aumentando consequentemente os níveis de andrógenos, como a

testosterona, e resultando na masculinização da fêmea (Oehlmann e Schulte-Oehlmann, 2003; Horiguchi, 2009). Entretanto, estudos sobre os efeitos crônicos do TBT sobre aspectos reprodutivos de bivalves são praticamente inexistentes. Como já foi visto no capítulo II, há registros de ocorrência de intersex em bivalves, entretanto não existem estudos que comprovem a atuação do TBT sobre este fenômeno. Neste estudo, a análise histológica das gônadas não revelou intersexualidade nos indivíduos expostos ao TBTCI.

Gagné et al. (2003) relataram a ocorrência de alterações sexuais em *M. arenaria* coletados em uma zona portuária no estuário Saint Lawrence, Canadá. Segundo os autores, indivíduos coletados em pontos mais próximos ao porto apresentaram menores valores no índice de condição e gonadossomático, como também o status da maturação da gônada dos machos foi claramente retardado. As fêmeas coletadas também neste sítio apresentaram as menores concentrações de estradiol. Os autores atribuem os efeitos observados à contaminação por Tributilestanho. Em um estudo posterior Gagné et al (2006) coletaram bivalves da espécie *Mya arenaria* em dois locais contaminados por TBT e metais pesados, e observaram que nos locais mais poluídos houve um aumento na razão sexual macho/fêmea e uma diminuição no índice gonadossomático.

Em geral, a qualidade da água nos ambientes aquáticos, é avaliada através de métodos analíticos modernos, como instrumento de análise em laboratório. No entanto, estes métodos são normalmente caracterizados como um processo não-contínuo (Moroishi et al., 2009). Segundo Kramer et al. (1989), mudanças fisiológicas e comportamentais são eficazes no monitoramento biológico, pois oferecem uma rápida resposta e possibilitam a realização de um monitoramento contínuo. Neste sentido, o monitoramento do movimento das valvas e da taxa de filtração de *M. leucophaeta* e *M. charruana* podem ser ferramentas eficazes para avaliar a contaminação e os efeitos do tributilestanho no ambiente.

Os resultados demonstram que *M. charruana* é mais sensível a exposição ao Tributilestanho que *M. leucophaeta*. e outros bivalves. Outros estudos devem ser realizados para avaliar a respostas destas duas espécies a diferentes perturbações e diferentes contaminantes. *M. leucophaeta* já pode ser observado em vários pontos do estuário, e por ter sobreposição parcial de habitat com *M. charruana*, a sua maior resistência a contaminação pode favorecer seu estabelecimento e a exclusão de *M. charruana* em determinadas regiões do estuário. Parâmetros como taxa de filtração e movimentação das valvas demonstraram ser ferramentas eficazes no monitoramento da

contaminação por Tributilestanho, podendo estes ser utilizados em ensaios de toxicidade com outros compostos. A exposição ao TBT nas concentrações utilizadas nos tratamentos não foi suficiente para resultar em anormalidades na gônada a nível histológico. Estudos mais prolongados devem ser realizados para avaliar de forma mais eficaz os efeitos do TBT sobre aspectos reprodutivos *M. leucophaeta*, bem como de outros bivalves.

6. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que *M. charruana* é mais sensível a exposição ao Tributilestanho que *M. leucophaeta*. Outros estudos devem ser realizados para avaliar a respostas destas duas espécies a diferentes perturbações e diferentes contaminantes. *M. leucophaeta* já pode ser observado em vários pontos do estuário, e por ter sobreposição parcial de habitat com *M. charruana*, a sua maior resistência a perturbação pode favorecer seu estabelecimento e a exclusão de *M. charruana* em determinadas regiões do estuário. Parâmetros como taxa de filtração e movimentação das valvas demonstraram ser ferramentas eficazes no monitoramento da contaminação por Tributilestanho, podendo estes ser utilizados em ensaios de toxicidade com outros compostos. A exposição ao TBT às concentrações utilizadas nos tratamentos não foi suficiente para resultar em anormalidades na gônada a nível histológico. Estudos mais prolongados devem ser realizados para avaliar de forma mais eficaz os efeitos do TBT sobre aspectos reprodutivos *M. leucophaeta*, bem como para outros bivalves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, R. T., DANCE, S. P. 2000. Compendium of seashells. Odyssey, 411p.
- ADIYODI, K. G., ADIYODI, R. G. 1988. Reproductive biology of invertebrates. John Wiley and Sons. 542p.
- AIT FDIL, M., A.; MOUABAD, A.; OUTZOURHIT, A.; BENHRA, A.; MAAROUF, J.; PIHAN, C. 2006. Valve movement response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to metals (Cu, Hg, Cd and Zn) and phosphate industry effluents from Moroccan Atlantic coast. *Ecotoxicology* 15: 477–486.
- ALZIEU, C., 2000. Impact of Tributyltin on Marine Invertebrates. *Ecotoxicology* 9: 71–76.
- AONO, A., TAKEUCHI, I. 2008. Effects of tributyltin at concentrations below ambient levels in seawater on *Caprella danilevskii* (Crustacea: Amphipoda: Caprellidae). *Marine Pollution Bulletin* 57: 515–523.
- ARAGÃO, M. A., ARAÚJO, R. P. A. 2006. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. (Ed.) *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMA, 472p.
- ARAÚJO, A. M. 1999. Bacia do Pina. Disponível em: http://www2.uol.com.br/JC/_1999/1503/cm1403a.htm. Acesso em: 10 de Janeiro de 2011.
- ASSIS, R. C. F. 1985. Maturação Sexual de *Lucina pectinata* (Gemelin, 1791) (Mollusca- Bivalvia). *Universitas*, (34): 72 – 92.
- ÁVILA, S. P., MELO, P. J., LIMA, A., AMARAL, A., MARTINS, A. M. F., RODRIGUES, A. 2008. Reproductive cycle of the rissoid *Alvania mediolittoralis* Gofas, 1989 (Mollusca, Gastropoda) at São Miguel Island (Azores, Portugal). *Invertebrate Reproduction and Development*, 52 (1–2): 31–40.
- AXIAK V, SAMMUT M. 1995. Laboratory and field investigations on the effects of organotin_TBT.on the oyster *Ostrea edulis*. *Sci. Total Environ*, 171:117-120.

- BAMBER, R. N., TAYLOR, J. D. 2002. The brackish water mussel *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad, 1831) (Bivalvia: Dreissenidae) in the river Thames. *Journal of Conchology*, 37: 403–404.
- BAPTISTA, D. F. 2008. Uso de macroinvertebrados em procedimentos de biomonitoramento em ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12 (3): 425-44.
- BARBOUR, M.T., J. GERRITSEN, B.D. SNYDER, J.B. STRIBLING. 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.
- BARNABÉ, G. 1994. Aquaculture: biology and ecology of cultured species. Taylor & Francis. 403p.
- BARREIRA, C. A. R., ARAÚJO, M. R. L. 2005. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliiana* (gmelin, 1791) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 31 (1): 9 – 20.
- BAYNE, B. L. 1976. Marine mussels, their ecology and physiology. Cambridge University Press, 506 p.
- BELLOTTO, V. R., DE BRITO, P. C., MANZONI, G., WEGNER, E. 2005. Biomonitoramento ativo de metais traço e efeito biológico em mexilhões transplantados para área de influência de efluente de indústria de beneficiamento de aço - fase I. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, 9 (2): 33-37.
- BERTO, D., BOSCOLO, R., CACCIATORE, F., GIANI, M. 2006. Organotins Used in Antifouling Paints: Environmental Impact and Contamination in a Case Study (Southern Venice Lagoon). *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, 35(3): 269-283.
- BILA, D. M., DEZOTTI, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Química Nova*, 30 (3): 651-666.
- BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. 2004. O emprego de técnicas analíticas na especiação de metais pesados e a sua importância para o estudo do ambiente. *Laboratório de Química Ambiental – LQA/UNICAMP, Caderno Temático*, 2: 1-18.
- BRAUNBECK, T., HINTON, D. E, STREIT, B. 1998. Fish Ecotoxicology. Birkhauser, 396pp.

- BUSS, D. F., BAPTISTA, D. F., NESSIMIAN, J. L. 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas e avaliação da qualidade da água de rios. *Cad. Saúde Pública*, 19 (2): 465-473.
- CARPES-PATERNOSTER, S. 2003. Ciclo reprodutivo do marisco-do-mangue *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) no Manguezal do Rio Tavares – Ilha de Santa Catarina/SC. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina. 40p.
- CASTRO, I. B., CASCON, H. M., FERNANDEZ, M. A. 2000. Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) uma indicação da contaminação por organoestênicos na costa do município de Fortaleza – Ceará – Brasil. *Arq. Ciên. Mar*, 33: 143-148.
- CASTRO, I., BRAGA, A. R. C., ROCHA-BARREIRA, C., A. 2005. Altos índices de imposex em *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) em áreas portuárias dos Estados de Alagoas e Sergipe, Brasil. *Tropical Oceanography*, 33 (2): 121-128.
- CASTRO, I. B.; ALVES DE LIMA, A. F.; BRAGA, A. R. C.; ROCHA-BARREIRA, C. A. 2007. Imposex in two muricid species (Mollusca: Gastropoda) from the northeastern Brazilian Coast. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 2 (1): 81-91.
- CASTRO, Í.B.D., MEIRELLES, C.A.O.D., MATTHEWS-CASCON, H., ROCHA-BARREIRA, C.D.A., PENCHASZADEH, P., BIGATTI, G., 2008. Imposex in endemic volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51: 1065-1069.
- CEUTA, L. O. 2010. Parasitos e histopatologia do marisco-do-mangue, *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae), da Baía de Camamu (Bahia). Dissertação (mestrado) Universidade Estadual de Santa Cruz, 43p.
- CHAMP, M. A., SELIGMAN, P. F. 1996. Organotin: environmental fate and effects. Springer, 623pp.
- CHAMP, M.A., 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *The Science of The Total Environment*, 258: 21-71.
- CHAPMAN, D., JACKSON, J. 1996. Biological monitoring. *In: Water Quality Monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes*. Bartram, J, Ballance, R. (Eds). E & FN Spon, 383p.

- CHEN, Y. ,ZUO, Z., CHEN, S., YAN, F.,YANG, Z.,WANG, C. 2008. Reduction of spermatogenesis in mice after tributyltin administration. *Toxicology* 251: 21–27.
- CHESMAN, B.S., LANGSTON, W.J., 2006. Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? *Biology letters* 2: 420-422.
- CHOI, M., CHOI, H.-G., MOON, H.-B., KIM, G.-Y., 2009. Spatial and temporal distribution of tributyltin (TBT) in seawater, sediments and bivalves from coastal areas of Korea during 2001–2005. *Environmental Monitoring and Assessment* 151: 301-310.
- CHRISTO, S.W. & ABSHER, T.M. 2001. Ciclo reprodutivo de *Mytella guyanensis* e *Mytella charruana* (BIVALVIA:MITILIDAE), na Baía de Paranaguá, Paraná. *In: IX Congresso Latinoamericano de Ciências do Mar, San Andrés isla (Colômbia). Resumos...p.88.*
- CHUSHENG, W., XIULAN, Z., RONGZHONG, C. 1993. The effects of pollutants on the filtration rate of *Perna viridis* (Bivalvia:Mytilidae). *In: MORTON, B. The marine biology of the South China Sea: proceedings of the First International Conference on the Marine Biology of Hong Kong and the South China Sea. Kent State University Press: 253-260p.*
- CONNELL, D., P. LAM, B. RICHARDSON, R. WU, 1999. Introduction to Ecotoxicology. Blackwell Science Ltd Paris. 170p.
- COVARRUBIAS, D. A. V., SARABIA, N. P., ORDOÑEZ, E. O GALICIA1, E. U.,PÉREZ, J. B. 2009. Influencia de la temperatura, sobre el ciclo gonádico de *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad, 1831) (Bivalvia, Dreissenaceae, Dreissenidae) de la laguna de Tampamachoco, Tuxpan Veracruz. XXXII Congreso Nacional de Histología.
- CRUZ, R. A., VILLALOBOS, C. R. 1993. Shell length at sexual maturity and spawning cycle of *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) from Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 41 (1): 89-92.
- DAFFORN, K. A., GLASBY, T. M., JOHNSTON, E. L., 2008. Differential effects of tributyltin and copper antifoulants on recruitment of non-indigenous species. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 24, 23 - 33.
- DAMATO, M. 2001. O emprego de indicadores biológicos na determinação de poluentes orgânicos perigosos. *In: MAIA, N.; MARTOS, H.; BARRELLA, W. (org.)*

Indicadores Ambientais: Conceitos e Aplicações. São Paulo, EDUC/COMPED/INEP, 2001

DAVIDSON, B. M., VALKIRS, A. O., SELIGMAN, P. F. 1986. Acute and chronic effects of tributyltin on the mysid *Acanthomysis sculpta* (Crustacea, Mysidacea), In: Proceedings of Oceans' 86 Conference Record, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE): 1219–1225.

DEZOTTI, M. 2008. Processos e técnicas para o controle ambiental: de afluentes líquidos. Editora E-papers, 359p.

DOMINGUES, D. F., BERTOLLETTI, E. 2006. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: Zagatto, P.A.; Bertolletti, E. (Ed.) *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMA 472pp.

ENGLUND, V., HEINO, M. 1994. Valve movement of *Anodonta anatina* and *Unio tumidus* (bivalvia, unionidae) in a eutrophic lake *Annales Zoologici Fennici* 31: 257-262.

EPA. 2003. Ambient water quality criteria for Tributyltin (TBT)-draft.

FARIAS, M. F. 2008. Ciclo reprodutivo, distribuição populacional e condições microbiológicas de *Tagelus plebeius* (Lighfoot, 1786) (MOLLUSCA: BIVALVIA: SOLECURTIDAE) no estuário do rio ceará em Fortaleza – CE. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará. 153p.

FERNANDEZ, M. A., LIMAVERDE, A. M., CASTRO, I. B. D., ALMEIDA, A. C. M., WAGENER, A. D. L. R., 2002. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 18: 463-476.

FIGUEROA, A. S., MARTÍNEZ, C. C. 2009. Alterations of valve closing behavior in juvenile Catarina scallops (*Argopecten ventricosus* Sowerby, 1842) exposed to toxic metals. *Ecotoxicology* 18:983–987.

FORBES, V. E., FORBES T. L. 1994. *Ecotoxicology in theory and practice*. Springer, 247p.

GALVÃO, P. M. A., REBELO, M. F., GUIMARÃES, J. R. D., TORRES, J. P. M., MALM, O. 2009. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos

e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. Braz. J. Aquat. Sci. Technol., 13 (2): 59-66.

GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. 2003. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. Química Nova, 26 (5): 708-716.

GOMES T., GONZALEZ-REY M., BEBIANNO M. J. 2009. Incidence of intersex in male clams *Scrobicularia plana* in the Guadiana Estuary (Portugal). Ecotoxicology, 18: 1104–1109.

GOSLING, E. 2003. Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture. Blackwell Science, Oxford, 431 p.

GOULART, M. D., CALLISTO, M. 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. Revista da FAPAM 2 (1): 156-164.

GREGORY, M. A., MARSHALL, D. J., GEORGE, R. C., ANANDRAJ, A., MCCLURG, T. P., 2002. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. Mar. Pollut. Bull.

GUOLAN, H; YONG, W. 1995. Effects of Tributyltin chloride on marine bivalve mussels. Water Research, 29 (8): 1877-1884.

HARINO, H., FUKUSHIMA, M., KAWAI, S. 1999. Temporal trends of organotin compounds in the aquatic environment of the Port of Osaka, Japan. Environmental Pollution 105: 1-7.

HENRIQUES, M. B. 2004. Resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. 103p.

HERAL M., ALZIEU C., DESLOUS-PAOLI J. 1989. Effect of organotin compounds (TBT) used in antifouling paints on cultured marine molluscs - a literature study. In : Aquaculture - a biotechnology in progress (De Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors, N. Wilkins (Eds), 1081-1089.

HOCH, M. 2001. Organotin compounds in the environment — an overview. Applied Geochemistry 16: 719–753.

- HUANG, Y., ZHU, L., LIU, G. 2006. The effects of bis(tributyltin) oxide on the development, reproduction and sex ratio of calanoid copepod *Pseudodiaptomus marinus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 69: 147-152.
- KÁDÁR, E., SALÁNKI, J., JUGDAOHSINGH, R., POWELL, J. J., MCCROHAN, C. C., WHITE, K. N. (2001) Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat Toxicol.* 55, 137-148.
- KANNAN, K., TANABE, S. 2009. Global contamination by organotin compounds. In: Arai T, Harino H, Ohji M, Langston WJ (eds) *Ecotoxicology of antifouling biocides*. Part II. Springer, Tokyo: 39–60.
- KARR, J.R., FAUSCH, K.D., ANGERMEIER, P.L., YANT, P.R., SCHLOSSER, I.J., 1986. Assessing Biological Integrity in Running Waters. A Method and Its Rationale. Illinois Natural History Survey Special Publication 5, 28p.
- KRAAK, M. H. S.; TOUSSAINT, M.; LAVY, D.; DAVIDS, C. 1994. Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution* 84: 139–143.
- KRAMER, K. J. M., JENNER, H. A. & DE ZWART, D. (1989). The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, 199/189, 433-43.
- JENNER, H. A., J. W. WHITEHOUSE, C. J. L. TAYLOR, KHALANSKI, M. 1998. Cooling water management in European power stations: Biology and control of fouling. *Hydroécologie Appliquée*, 10:1-255.
- LIAO C. M., JOU L. J., CHEN B. C. (2005) Risk-based approach to appraise valve closure in the clam *Corbicula fluminea* in response to waterborne metals. *Environ Pollut* 135:41–52.
- LIAO, C. M., JAU, S. F., LIN, C. M., JOU, L. J., LIU, C. W., LIAO, V. H. C., CHANG, F. J. 2009. Valve Movement Response of the Freshwater Clam *Corbicula Fluminea* Following Exposure to Waterborne Arsenic. *Ecotoxicology* : 1-10.
- LIMA, F.C; ABREU, M. G.; MESQUITA, E. F. M. 2001. Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53: 203-206.
- LIMA, A. F. A. D., CASTRO, Í. B. D., ROCHA-BARREIRA, C. D. A., 2006. Imposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda:

Muricidae) submitted to an organotin-contaminated diet. Brazilian Journal of Oceanography 54: 85-90.

LIMA, M. P. R. 2003. Variação espacial da macrofauna bentônica do Estuário da Baía do Pina – Recife-PE. Monografia em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. 33pp.

MACHADO, R. C. V. 2010. Rio Capibaribe, Recife, PE. Pesquisa Escolar On-Line, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Disponível em: <<http://www.fundaj.gov.br>>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2001.

MACKIE, G., CLAUDI, R. 2009. Monitoring and control of macrofouling mollusk in freshwater systems, CRC press, 550p.

MAIA, F.; SOBRAL, M.P.; GASPAR, M., 2006. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ria de Aveiro. Bases científicas para a gestão destes recursos. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital* (<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>) (30): 35p.

MARKICH, S. J., BROWN, P. L., JEFFREE, R. A., LIM, R. P. 2000. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquatic Toxicology* 51: 155–175.

MARQUES, B. F. 2008. Avaliação da Toxicidade Aguda de Organoestânicos sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979). Monografia, Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS. 37pp.

MARQUES, C. G. 2004. Aspectos Reprodutivos do Berbigão *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia: Veneridae) na Enseada de Caraguatatuba, São Paulo – Brasil. Monografia, Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, São Paulo – S, 67p.

MARTÍ, M. A. C. 2007. Principios de Ecotoxicología. Editorial Tebar, 320 p.

MESQUITA, E. .F. M., ABREU, M. G. D., LIMA, F. C. D., 2001. Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus) (Molusca, Bivalvia) da Lagoa de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18: 631-636.

MCALLISTER, B.G., KIME, D.E. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 65: 309–316.

- MORAES, R., CRAPEZ, M., PFEIFFER, W., FARINA M., BAINY A., TEIXEIRA V. 2001. Efeitos de Poluentes Em Organismos Marinhos. Arte & Ciência, São Paulo, 288p.
- MOROISHI, J., KANG, I. J., NAGAFUCHI, K., HONJO, T., SHIMASAKI¹, Y., OSHIMA¹, Y. 2009. Biological Monitoring to Detect Both Water Pollution and Water Quality Recovery Based on Valve Movements of Freshwater Bivalves (*Corbicula japonica*). J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 54 (2), 413–420.
- MURAI, R., TAKAHASHI, S., TANABE, S., TAKEUCHI, I. 2005. Status of butyltin pollution along the coasts of western Japan in 2001, 11 years after partial restrictions on the usage of tributyltin. Marine Pollution Bulletin 51: 940-949.
- NEWELL, R., T. HILBISH, R. KOEHN, C. NEWELL. 1982. Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. Biological Bulletin, 162: 299–310.
- NOGUEIRA, J.M.F. 2003. Desreguladores Endócrinos: Efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos (Boletim da Sociedade Portuguesa de Química), 88: 65-71
- OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U. 2003. Endocrine disruption in invertebrates. Pure Appl. Chem., 75 (11–12): 2207–2218,
- OETKEN, M., BACHMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U., OEHLMANN, J., 2004. Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates, in: Kwang, W.J. (Ed.), International Review of Cytology. Academic Press: 1-44.
- ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., CAJARAVILLE, M.P., 2010. Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 693-701.
- OSPAR Commission. 2000. Background Document on Organic Tin Compounds. 16pp.
- PAGE, D. S. 1995. A six-year monitoring study of tributyltin and dibutyltin in mussel tissues from the Lynher River, Tamar Estuary, UK. *Marine Pollution Bulletin*. 30: 746-749.
- PIOLA, R. F., JOHNSTON, E. L. 2009. Comparing differential tolerance of native and non-indigenous marine species to metal pollution using novel assay techniques. Environmental Pollution, 157: 2853–2864

- PIVETTA F., MACHADO J. M. H., ARAÚJO U. C., MOREIRA M. F. R., APOSTOLI P. 2001. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. *Cad Saúde Pública*, 17(3):545-54.
- PLETSCH, A. L.; BERETTA, M.; TAVARES, T. M. 2010. Distribuição espacial de compostos orgânicos de estanho em sedimentos costeiros e em *Phallusia nigra* da Baía de Todos os Santos e litoral norte da Bahia - Brasil. *Quím. Nova*, São Paulo, 33 (2): 451-457.
- PRÓSPERI, V. A.; NASCIMENTO, I. 1996. A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. In: Zagatto, P.A.; Bertolotti, E. (Ed.) *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMA, 472p.
- PURCHON, R. D. 1977. The biology of the Mollusca. 2° ed. Pergemon Press, New York. 560p.
- RAJAGOPAL, S.; VAN DER VELDE, G.; JENNER, H. A. 1997. Shell valve movement response of dark false mussel, *Mytilopsis leucophaeta*, to chlorination. *Water Research*, 31: 3187–3190.
- RAJAGOPAL, S.; VENUGOPALAN, V. P.; VAN DER VELDE, G.; JENNER S. 2003. Tolerance of five species of tropical marine mussels to continuous chlorination. *Marine Environmental Research*, 55: 277–291.
- RAND, G. M., WELLS, P. G., McCARTY, L. S. 1995. Introduction of aquatic toxicology. In: RAND, G. M. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environment fate and risk assessment. Taylor & Francis, 1125pp.
- RIBEIRO, C. S., ROCHA, R. M. 2006. Invertebrados: Manual de Aulas Práticas. Editora Holos, Ribeirão Preto, 226 p.
- RIOS, E. C. Seashells of Brazil. 1985. Editora da Fundação Rio Grande, 432p.
- RÜCKERT, G. V., CAMPOS, M. C. S., ROLLA, M. E. 2004. Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria. *Maringá*, 26 (4): 421-429.
- RUIZ, G. M., FOFONOFF, P., HINES, A. H. 1999. Non-indigenous species as stressors in estuarine and marine communities: Assessing invasion impacts and interactions. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 950–972.

- RUIZ, J. M.; BRYAN, G. W.; WIGHAM, G. D. GIBBS, P. E. 1995. Effects of tributyltin (TBT) exposure on the reproduction and embryonic development of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Marine Environmental Research*, 40 (4): 363-379
- RUPPERT, E. E., BARNES, R. D. 1996. *Zoologia dos Invertebrados*. 6ed. São Paulo: Roca, 1029p.
- SALAZAR, M. H., SALAZAR, S. M. 1989. Acute Effects of (Bis)tributyltin Oxide on Marine Organisms. Summary of Work Performed 1981 to 1983. Naval Ocean Systems Center San Diego CA, 85p.
- SANTALLA, R. M. 2008. Especificação de organoestânicos em matrizes ambientais por extração sorptiva em barra de agitação e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, 84pp.
- SANTAMARTA, J. 2001. A ameaça dos disruptores endócrinos. *Revista de Agroecologia e Desenvolvimento Rural*, 2 (3): 18-29.
- SANTOS, G. T.; BEZERRA-JUNIOR, J.L.; COSTA, K.M.P.; FEITOSA, F.A.N. 2009. Dinâmica da biomassa fitoplanctônica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia Do Pina, Recife, PE). *Rev. Bras. Enga. Pesca* 4 (1): 95-109.
- SASTRY, A. N. 1963. Reproduction of the Bay Scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of Temperature on Maturation and Spawning. *Biological Bulletin*, 125 (1): 146-153.
- SIDALL, S. E., 1980. Early development of *Mytilopsis leucophaeata* (Bivalvia: Dreissenacea). *The Veliger*, 22: 378-379.
- SOUZA, J. R .B.; ROCHA, C. M. C.; LIMA, M. P. R. 2005. Ocorrência do Bivalve exótico *Mytilopsis leucophaeta* (Conrad), (Mollusca, Bivalvia), no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22 (4): 1204-1206.
- STENYAKINA, A., WALTERS, L.J., HOFFMAN, E.A., CALESTANI, C., 2010. Food availability and sex reversal in *Mytella charruana*, an introduced bivalve in the southeastern United States. *Molecular Reproduction and Development* 77: 222-230.
- SUJATHA, C. H., NAIR, S. M., CHACKO, J., 1996. Tributyltin Oxide Induced Physiological and Biochemical Changes in a Tropical Estuarine Clam. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56, 303-310.

- THAIN, J. 1986. Toxicity of TBT to Bivalves: Effects on Reproduction, Growth and Survival. *Oceans*, 18: 1306- 1313.
- TRAN, D., FOURNIER, E., DURRIEU, G., MASSABUAU, J. 2007. Inorganic mercury detection by valve closure response in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: integration of time and water metal concentration changes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26 (7): 1545–1551.
- TUNNELL, J. W., J., BARRERA, N. C., MORETZSOHN, F. 2010. Encyclopedia of Texas Seashells: Identification, Ecology, Distribution, and History. Texas A&M University Press, 512 p.
- USEPA, 2011. Statistical Analysis for Biological Methods. Trimmed Spearman-Kärber Method. Acessado em 5 de abril de 2011 em <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm#tsk>.
- VALENTIN, A. C. S., DEZOTTI, M. 2008. Ensaios de Toxicidade. *In*: DEZOTTI, M. 2008. Processos e técnicas para o controle ambiental: de afluentes líquidos. Editora E-papers. 309-354p.
- VENTURA, C. R. R., PIRES, D. O. 2009. Ciclo de Vida de Invertebrados Marinhos. *In*: PEREIRA, R. C., SOARES-GOMES, A. (Org.) *Biologia Marinha*, 2º ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2009.
- VERWEEN, A. et al. 2009. Seasonal variation in gametogenesis and spawning of *Mytilopsis leucophaeata*, an invasive bivalve in Europe. *Journal of Molluscan Studies* 75: 307–310.
- VERWEEN, A., VINCX, M. & DEGRAER, S. 2010. *Mytilopsis leucophaeata*: the brackish water equivalent of *Dreissena polymorpha*? A review. *In*: The zebra mussel in Europe. VAN DER VELDE, G., RAJAGOPAL S., BIJ DE VAATE, A.(eds.) Margraf Publishers. 490p.
- VERWEEN, A., VINCX, M., MEES, J., DEGRAER, S. 2005. Seasonal variability of *Mytilopsis leucophaeata* larvae in the harbour of Antwerp: implications for ecologically and economically sound biofouling control. *Belgian Journal of Zoology*, 135: 91-93.
- WAITE, M.E., WALDOCK, M.J., THAIN, J.E., SMITH, D.J., MILTON, S.M., 1991. Reductions in TBT concentrations in UK estuaries following legislation in 1986 and 1987. *Marine Environmental Research* 32: 89-111.

- WANGKULANGKUL, K. 2009. Variability in Recruitment of Non-native mussel *Mytilopsis adamsi* Morrison, 1946 in Haad-kaew Lagoon, Songkhla Province. Dissertação de mestrado. Prince of Songkla University, Tailândia. 105p.
- WHITFIELD, J. 2001. Vital signs. *Nature*, 411 (28): 989-990.
- ZAGATTO, P. A. 2006. O uso de substâncias de referência no controle da qualidade de ensaios ecotoxicológicos. *In*: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. (Ed.) *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMA, 472pp.
- ZARONI, L. P., ABESSA, D. M. S., RACHID, B. R. F., SOUSA, E. C. P. M. 2001. Diferenças no estado fisiológico de adultos e na viabilidade de embriões do mexilhão *Perna perna* provenientes de duas populações coletadas em Ubatuba – SP. *In*: MORAES, R., CRAPEZ, M., PFEIFFER, W., FARINA M., BAINY A., TEIXEIRA V. *Efeitos de Poluentes Em Organismos Marinhos*. Arte & Ciência, São Paulo, 288p.